



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

⑨⑦ EP 0 722 363 B 1

⑩ DE 694 17 908 T 2

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
B 01 L 11/00

- |    |   |                |
|----|---|----------------|
| ②① | Deutsches Aktenzeichen:                               | 694 17 908.6   |
| ⑥⑤ | PCT-Aktenzeichen:                                     | PCT/US94/11090 |
| ⑨⑥ | Europäisches Aktenzeichen:                            | 94 929 964.8   |
| ⑧⑦ | PCT-Veröffentlichungs-Nr.:                            | WO 95/10035    |
| ⑧⑥ | PCT-Anmeldetag:                                       | 29. 9. 94      |
| ⑧⑦ | Veröffentlichungstag<br>der PCT-Anmeldung:            | 13. 4. 95      |
| ⑧⑦ | Erstveröffentlichung durch das EPA:                   | 24. 7. 96      |
| ⑧⑦ | Veröffentlichungstag<br>der Patenterteilung beim EPA: | 14. 4. 99      |
| ④⑦ | Veröffentlichungstag im Patentblatt:                  | 25. 11. 99     |

DE 694 17 908 T 2

- ③⑩ Unionspriorität:  
129243                      29. 09. 93    US
- ⑦③ Patentinhaber:  
Biogenex Laboratories, San Ramon, Calif., US

- ⑦④ Vertreter:  
Glawe, Delfs, Moll & Partner, Patentanwälte, 80538  
München

- ⑧④ Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC,  
NL, PT, SE

- ⑦② Erfinder:  
TSEUNG, Ken, Fremont, CA 94538, US; WONG,  
Wai, Bun, Fremont, CA 94556, US; JONES,  
Christopher, Michael, Walnut Creek, CA 94596, US;  
KALRA, Krishan, L., Danville, CA 94506, US

⑤④ AUTOMATISCHES EINFÄRBUNGSVERFAHREN UND - VORRICHTUNG

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 694 17 908 T 2

BEST AVAILABLE COPY

13.07.99

94 929 964.8

UG/gh/jj/bs

BIOGENEX LABORATORIES

### Automatisches Einfärbungsverfahren und -vorrichtung

Die mikroskopische Untersuchung von nicht gefärbten Zell- und Gewebepreparationen leidet oft an einem Fehlen von Kontrast zwischen einzelnen Zellen und der Hintergrundmatrix oder zwischen einzelnen Zellteilen. Um diese Schwierigkeit zu beseitigen, sind bei der mikroskopischen Untersuchung von Geweben über ein Jahrhundert lang Farben (Färbemittel), die von Zellen oder Teilen der Zellen unterschiedlich aufgenommen werden, verwendet worden.

Wegen der Art und Weise, mit welcher Objektträger mit Gewebepreparationen hergestellt werden (siehe Elias, J. "Immunohistopathology: A practical Approach to Diagnosis" ASCO Press, 1990, Seiten 3-4, for examples of such preparation), können die Größe und/oder der Ort einer Gewebeprobe auf einem Mikroskopobjektträger beträchtlich innerhalb einer großen Fläche des Objektträgers variieren. Für das Aufbringen eines Färbemittels an dem korrekten Ort auf einem Objektträger und für das Schaffen von Spülen und anderen Manipulationsschritten in geeigneten Zeiten und richtigen Mengen, wurden bis vor kurzem alle derartigen Einfärbevorgänge von Hand durchgeführt. Es ist klar zu ersehen, daß jedoch moderne Laboratorien, die eine große Anzahl von Gewebepreparationen untersuchen, es wünschenswert finden, den Einfärbevorgang zu automatisieren. Demgemäß haben eine Anzahl von Herstellern eine Ausrüstung für automatisches Einfärben von Gewebepreparationen auf Mikroskopobjektträgern entwickelt.

Beispielsweise ist in der US-PS Nr. 4,985,206 ein Apparat und ein Verfahren zum automatischen Aufbringen von Einfärbereagenzien auf einen dünnen Gewebeschnitt, der auf einen Mikroskopobjektträger montiert ist, beschrieben. Der Apparat und das Verfahren verwenden ein Element, das mit dem Mikroskopobjektträger zusammengebaut ist, um eine Umhüllung mit Kapillarabmessungen zu schaffen, in welche Flüssigkeiten injiziert werden können. Die Flüssigkeiten werden sequentiell dem Kapillarraum zugeführt, wobei das Zusetzen einer neuen Flüssigkeit die vorherige Flüssigkeit her austreibt. Eine Anzahl dieser Baugruppen von Mikroskopobjektträgern und speziellen Abdeckungen können in einem Gestell an einem Apparat für das automatisierte Zusetzen Flüssigkeiten platziert sein.

Ein weiterer automatisierter Immuno-Einfärbeapparat wird als Ventana 320<sup>TM</sup> bezeichnet, hergestellt von der Firma Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, Arizona. Dieser Apparat bringt eine Flüssigkeit, die als Liquid Coverslip<sup>TM</sup> bekannt ist, vor dem Zusetzen von Reagenz auf jeden Objektträger. Liquid Coverslip<sup>TM</sup> ist ein nicht-wässriges Material mit einer Dichte weniger als die von Wasser. Wenn ein in Wasser gelöstes Reagenz auf einem Mikroskopobjektträger aufgebracht wird, sinkt das Reagenz auf den Boden des Liquid Coverslip<sup>TM</sup>, um sich über die Oberfläche des Objektträgers zu verbreiten. Objektträger sind auf einem Karussell angeordnet, das unterhalb eines Ausgabekopfes zum Aufbringen der Reagenzien oder Waschfluide dreht.

Leica stellt einen automatischen Einfärbeautomaten her, der als Jung Histostainer Ig<sup>TM</sup> bekannt ist. Dies ist eine weitere Vorrichtung der Karussellbauart, aber Reagenzien werden durch einen Sprühvorgang anstatt durch Tropfen von Flüssigkeit auf einen organischen Film aufgebracht. Der Apparat enthält einen Permanent-Reagenzsprühkopf, der entlang einer einzigen Achse bewegt werden kann, um einem Mikroskopobjektträger eine Sprühabdeckung zu schaffen, der auf

dem rotierenden Trog liegt, wenn der Objektträger in eine Position unterhalb des Kopfes gedreht worden ist. Überschüssiges Reagenz wird durch eine Permanent-Reinigungsdüse entfernt, die Luft in einer Druckfront über den Objektträger bläst, wodurch am Ende des Reagenz-Inkubationsschrittes überschüssige Flüssigkeit zwangsweise entfernt wird.

Alle diese Apparate haben versucht, gewisse, einander entgegenstehende Ziele bei automatisierten Apparaten dieser Art zu lösen. Beispielsweise ist es wünschenswert, ein Minimum von teuren oder toxischen Reagenzien zu verwenden, insbesondere Reagenzien, die beim Immun-Einfärben (beispielsweise Antikörper oder andere Reagenzien biologischen Ursprungs), verwendet werden, wobei sichergestellt wird, daß ein vollständiges Abdecken des Mikroskopobjektträgers durch das Reagenz auftritt. Bei dem Sprühvorgang, auf den vorstehend zuletzt Bezug genommen wurde, wird jedoch ein Überschuß an Reagenz verwendet, der entfernt werden muß, um eine zufriedenstellende Abdeckung zu erzielen. Die anderen Techniken erfordern zusätzliche manipulative Schritte, wie beispielsweise die Verwendung einer von Hand aufzubauenden Abdeckung oder eines zusätzlichen flüssigen Reagenz, um ein sauberes Sprühen des Reagenz zu schaffen. Es wäre wünschenswert, einen automatischen Apparat zu haben, der ohne zusätzliche Manipulation reguläre Mikroskopobjektträger verwenden kann und der weder die Verwendung von Überschußreagenz oder die Verwendung einer organischen Flüssigkeit mit zusätzlicher Manipulation und Entfernungsschritten erfordert. Demgemäß sind weitere Entwicklungen notwendig, die es ermöglichen, daß einzelne Objektträger unterschiedlich in einem einzigen Probenvorgang behandelt werden und die einen automatisierten Vorgang, bei dem Reagenzien effizient verwendet werden, schaffen.

Diese Aufgaben sind erzielt worden, indem ein automatischer Einfärbungsapparat geschaffen worden ist, der mit einem Halterahmen; einem Arm, der in drei Dimensionen bewegbar am

13.07.99

Rahmen befestigt ist; Mitteln zum Bewegen des Arms; einem am Arm angeordneten Hohlspitzenkopf; Mitteln zum abwechselnden Zuführen von positivem oder negativem Gasdruck zum Hohlspitzenkopf; einer auswechselbaren Wasch-/Blasspitze mit einem Ausgangsschlitz im wesentlichen mit einer Länge gleich der Breite des Mikroskopobjektträgers, wobei die Wasch-/Blasspitze so ausgebildet ist, daß sie mittels einer vorgewählten Bewegung des Arms an dem Hohlspitzenkopf lösbar befestigt ist; einem Wasch-/Blasspitzenhalter an einem ersten feststehenden Ort am Rahmen; einem Reagenz-Aufbringspitzenhalter an einem zweiten feststehenden Ort am Rahmen zum Halten einer Reagenz-Aufbringspitze, wobei die Reagenz-Aufbringspitze so ausgebildet ist, daß sie an dem Hohlspitzenkopf durch eine vorgewählte Bewegung des Arms lösbar befestigt ist; einem Reagenz-Behälterhalter an einem dritten feststehenden Ort am Rahmen; einem Mikroskopobjektträgerhalter an einem vierten feststehenden Ort am Rahmen, wobei der Mikroskopobjektträgerhalter so ausgebildet ist, daß er den Mikroskopobjektträger auswechselbar enthalten kann; und einer Steuerung zum Steuern der Bewegung des Arms zwischen den Orten, so daß der Spitzenkopf die Wasch-/Blasspitze oder die Reagenz-Aufbringspitze in Antwort auf die Bewegung des Arms, gesteuert durch die Steuerung, aufnimmt und an einen oder mehrere Orte bewegt, um ein Reagenz in den Reagenzbehälter aufzunehmen oder das Reagenz auf den Objektträger auszugeben oder ein Gas oder eine Flüssigkeit durch die Wasch-/Blasspitze über dem Objektträger auszugeben.

Die Erfindung schafft auch verschiedene Subkomponenten des Apparates, die speziell für das Einfärben von Gewebe auf Objektträgern mit diesem Apparat ausgebildet sind. Eine Schlüsselkomponente ist ein Wasch-/Blaskopf, der ein Hohlkörperelement mit einem Innenhohlraum aufweist, der zugreifbar ist, wenn diese Teile gelöst sind; ein linearer Ausgangsschlitz, der eine Fluidkommunikation zwischen dem Innenhohlraum und der Außenumgebung, welche die Spitze umgibt, schafft, wobei der lineare Ausgangsschlitz im wesent-

13.07.99

lichen eine Länge gleich der Breite des Mikroskopobjektträgers hat, mit dem die Spitze verwendet werden soll; und Mittel zum lösbaren Befestigen des Hohlkörperelementes an einem Hohlspitzenkopf in dem Apparat gemäß der Erfindung und Schaffen eines Zugangs zu dem Innenhohlraum für eine Gas- oder Flüssigkeitszufuhr durch den Spitzenkopf.

Zusätzlich führt der Apparat eine Technik zum Aufbringen von Färbemittel auf Gewebepreparationen an unbekannten (einem Instrument) Orten auf einzelnen Objektträgern, was für den Apparat gemäß der vorliegenden Erfindung nicht spezifisch ist, sondern was an eine andere automatisierte Ausrüstung oder an manuelle Vorgänge angepaßt werden kann. Dieses Verfahren umfaßt Aufbringen eines dünnen Films aus Wasser auf eine horizontale Oberfläche eines Mikroskopobjektträgers und Aufbringen eines wasserlöslichen Färbemittelreagenz auf den Wasserfilm in einem Muster, das nicht ausreicht, um den Objektträger vollständig abzudecken, wenn der Objektträger trocken ist, wodurch das Reagenz durch den Film diffundiert, um im wesentlichen die gesamte Oberfläche zu erreichen, auf der ein Gewebe liegt, wobei ein Minimalvolumen des Reagenz verwendet wird.

Der Apparat wird nun zusammen mit seinem Betrieb beschrieben, wonach der Apparat und verschiedene Komponententeile im einzelnen anhand der Figuren beschrieben werden, die einen Teil der vorliegenden Veröffentlichung bilden.

Der Apparat gemäß der Erfindung hat einen Halterahmen, an welchem ein Arm in drei Richtungen bewegbar befestigt ist. Motoren oder andere Mittel zum Bewegen des Arms sind unter Steuerung eines Computers oder einer anderen elektronischen Steuervorrichtung vorgesehen, die ein Programmieren der Bewegung des Arms zwischen unterschiedlichen Arbeitsorten an oder innerhalb des Halterahmens zuläßt. An dem Arm ist ein Hohlspitzenkopf angeordnet, so daß Flüssigkeiten oder Luft durch den spitzen Kopf ausgegeben oder herausgezogen werden

können, um die verschiedenen Arbeitsvorgänge, wie im folgenden beschrieben, zu schaffen.

In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung ist ein einzelner Hohlspitzenkopf vorgesehen, an welchem einzelne Spitzen mit unterschiedlichen Funktionen befestigt sind. Bei einer insbesondere vorzuziehenden Ausführungsform ist der Spitzenkopf so ausgebildet, daß er Wegwerf-(disposable)-Kunststoffpipettenspitzen aus Standardbehältern aufnehmen kann, in welchen diese Spitzen zugeführt werden (beispielsweise Katalog-Nr. 3510-R der Firma E&K Scientific Products, Saratoga, Kalifornien). Diese Wegwerf-Pipettenspitzen werden derzeit in einem Behälter verkauft, der eine Basis der Spitze zum Einsetzen einer in der Hand gehaltenen Pipette durch eine Preßbewegung des Endes des Pipettenkörpers in die Hohlspitze darstellt, wobei die Spitzen in einem Feld angeordnet sind, so daß alle einzelnen Spitzen in dem Behälter für die Betriebsperson zugänglich sind. Wie aus der unten stehenden Beschreibung zu ersehen ist, kann die gleiche Standardbox mit Pipettenspitzen in dem Apparat gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Ein Schlüsselement des Apparates gemäß der Erfindung ist eine entfernbare Wasch-/Blasspitze mit einem Ausgangeschritt, der üblicherweise gleich oder im wesentlichen eine gleiche Länge wie die Breite eines Mikroskopobjektträgers hat. Wenn der Schlitz nicht gleich der Breite eines Mikroskopobjektträgers, der verwendet werden soll, ist, ist es vorzuziehen, daß der Schlitz etwas breiter als der Mikroskopobjektträger ist. Ein engerer Schlitz ist beim Entfernen von Flüssigkeit von der Oberfläche des Mikroskopobjektträgers, wie im folgenden beschrieben, weniger effektiv. Die praktische Breite eines Schlitzes ist jedoch durch den Wunsch begrenzt, eine Anzahl von Mikroskopobjektträgern nahe nebeneinander in dem Apparat gemäß der Erfindung angeordnet zu haben, und um weiterhin zu vermeiden, daß Puffer oder andere Waschlösungen, die auf einen Objektträger durch

die Spitze aufgebracht werden, verschwendet werden. Bei dem Blasvorgang, der überschüssige Wasch-/Pufferlösung entfernt, schafft der Ausgangsschlitz an der Wasch-/Blasspitze eine "Wand" aus Luft, die überschüssige Flüssigkeit von der Oberfläche eines Mikroskopobjektträgers stößt, wenn die Spitze und parallel zu einem Mikroskopobjektträger geführt wird (später im einzelnen beschrieben). Diese Wasch-/Blasspitze ist so ausgebildet, daß sie lösbar an demselben Hohlspitzenkopf befestigt werden kann, an welchem die anordenbaren Pipettenspitzen befestigt sind. Beide dieser Befestigungs-(und gegebenenfalls Löse-)Vorgänge können durch eine vorgewählte Bewegung des Arms durchgeführt werden, weitgehend auf eine gleiche Art und Weise, so daß die Wegwerf-Pipettenspitzen nun an das Ende einer handbetätigten Pipette angepreßt und später von dieser entfernt werden.

Der Halterahmen des Apparates ist mit Haltern an feststehenden Orten am Halterahmen sowohl für die Wasch-/Blasspitze als auch die Reagenzspitzen, neben anderen entfernbaren Teilen, vorgesehen. Somit erlaubt das Programmieren des Arms, damit dieser sich zu einem bestimmten feststehenden Ort bewegt und eine vorgewählte Bewegung oder einen anderen vorstehend erörterten Betrieb durchführt, daß die einzelnen Spitzen an dem Hohlspitzenkopf plazierte oder von diesem gelöst werden. Ein Halter für einen Reagenzbehälter (der Reagenzbehälter ist für Färbemittel oder verschiedene zum Färbemittel zugehörige Lösungen) und ein Mikroskopobjektträgerhalter sind ebenfalls auf einem Halterahmen an anderen feststehenden Orten vorhanden. Auf diese Art und Weise können standardisierte Bewegungen des Arms in der Steuereinheit programmiert sein, so daß individuelle Mikroskopobjektträger an spezifischen feststehenden Orten in dem Mikroskopobjektträgerhalter mit Reagenz und/oder Waschfluids behandelt werden können, die von den Reagenzbehältern oder von Flüssigkeiten, welche durch den Hohlspitzenkopf am bewegbaren Arm zugeführt worden sind, erhalten worden sind.



13.07.99

Bei einem typischen Betrieb des Apparates gemäß der Erfindung sind mehrere Objektträger, die jeder im allgemeinen an einem gewissen Ort auf ihrer Oberseite eine Gewebeprobe haben, horizontal in einem Trog plazierte, der in den Apparat an einem feststehenden Ort eingesetzt ist, üblicherweise einem Ort, der Registerstifte hat, welche in Registerlöcher in dem Trog passen (oder ähnliche Registermittel), so daß die einzelnen Mikroskopobjektträger immer in derselben Relativposition auf dem Rahmen des Apparates angeordnet sind. Der Apparat ist für das Behandeln der einzelnen Objektträger geeignet programmiert und Reagenzien und Reagenzbehälter sind an ihren eigenen vorbestimmten Orten in dem Apparat auf die gleiche Art und Weise wie der Trog, wie vorstehend beschrieben, plazierte. Reagenz-Applikationsspitzen sind ebenfalls zum Aufnehmen durch den bewegbaren Arm zur Verfügung gestellt. Beispielsweise kann eine Standardbox mit 1-ml-Pipettenspitzen in dem Apparat an ihrem vorherbestimmten Ort plazierte werden.

Wenn erst einmal alle Komponenten an Ort und Stelle sind, führt der Apparat die Schritte Applikation von Reagenz, Inkubation, Heizen (falls notwendig oder zweckmäßig) und Probspülen durch, um den gewünschten Färbeprozess durchzuführen. Bei einer typischen Betriebssequenz nimmt der bewegbare Arm eine lösbare Wasch-/Blasspitze mit einem schlitzförmigen Ausgang auf und auf jeden der Probenobjektträger, die in einem bestimmten Zyklus behandelt werden, wird eine Pufferlösung durch eine Flüssigkeitszuführleitung und ein Waschpufferreservoir, das über eine Zuführleitung an dem Hohlspitzenkopf befestigt ist, aufgebracht. Der Apparat verwendet dann dieselbe Wasch-/Blasspitze zum Abblasen von überschüssigem Puffer von dem Objektträger vor dem Zuführen von Reagenz. Dies wird durchgeführt, indem Luft durch die Spitze geblasen wird, während der Kopf entlang der Länge des Objektträgers läuft; aus dem Schlitz tritt eine "Wand" aus Luft aus und entfernt den überschüssigen Puffer von dem

Objektträger, ohne daß die Gewebeprobe abgetrennt wird. Auf dem Objektträger wird eine geringe Menge Puffer belassen, die zu dem Ausbreiten des Reagenz beiträgt. Die Wasch-/Blasspitze wird dann durch den automatisierten Arm in ihren Halter zurückgeführt.

Der Arm nimmt dann aus der Pipettenspitzenbox, die in den Reagenz-Applikationsspitzenhalter im Apparat eingesetzt worden ist, eine Einwegpipette heraus. Der Arm mit der daran befestigten Pipettenspitze nimmt aus einer Reagenzampulle ein Reagenz auf, das auf einen Objektträger oder eine Gruppe von Objektträgern aufgebracht werden soll. Mit dem Reagenz können gleichzeitig eine Anzahl von Objektträgern behandelt werden. Das Reagenz wird auf den Objektträger in einem vorher bezeichneten Muster aufgebracht, das in Kombination mit dem dünnen Flüssigkeitsfilm auf dem Mikroskopobjektträger zusammenarbeitet, um ein Ausbreiten des Reagenz über die gesamte Oberfläche des Objektträgers, auf welchem das Gewebe befestigt sein kann, ausgebreitet wird. Der dünne Flüssigkeitsfilm ermöglicht, daß weniger Reagenz verwendet werden kann als dies erforderlich wäre, wenn kein Film vorhanden wäre, der zu dem Ausbreiten des Reagenz beiträgt.

Die Einwegpipettenspitze wird dann weggebrochen und der bewegbare Arm nimmt die Wasch-/Blasspitze für das Zusetzen von Puffer und nachfolgendem Wegblasen von überschüssigem Puffer für die nächste Gruppe von zu bearbeitenden Objektträgern auf, während die ersten Gruppe von Objektträgern mit dem Reagenz inkubiert werden und danach wird die Wasch-/Blasspitze in ihren Halter zurückgeführt. Der Arm nimmt dann die nächste zur Verfügung stehende Einwegpipettenspitze aus der Spitzenbox auf und wie zuvor wird Reagenz in die Spitze eingezogen und aufgebracht. Geeignete Schritte werden so lange wiederholt, bis alle Objektträger mit Reagenz behandelt worden sind oder bis eine Reagenzinkubation been-

det ist, so daß Reagenzien von den entsprechenden Objektträgern entfernt werden müssen.

Wenn eine Reagenzinkubation beendet ist, werden die Objektträger gespült, wenn der bewegbare Arm wieder die Wasch-/Blaspitze aufnimmt und es wird auf den Objektträger Puffer aufgebracht, um den Hauptteil des Reagenz abzuspülen. Der Wasch-/Blaskopf bläst dann den überschüssigen Puffer von dem Objektträger und der Objektträger wird ein zweites Mal, falls notwendig, mit dem über die Leitung zur Verfügung stehenden Puffer gespült. Dieser Vorgang des Spülens und Trocknens eines Objektträgers wird, wie notwendig, in Abhängigkeit von dem individuellen Färbemittel und dem zweckmäßigen Vorgang zum Spülen des Reagenz wiederholt. Der Steuermechanismus, im allgemeinen ein programmierbarer Computer, hält den Zeitablauf der unterschiedlichen Inkubationszeiten ein und wiederholt die vorstehenden Schritte, falls dies zweckmäßig ist, um Reagenz auf alle Objektträger aufzubringen, die in den Trog eingesetzt worden sind.

Ein spezielles Merkmal des Apparates gemäß der Erfindung, das eine effiziente Verwendung des Reagenz erlaubt, ist das Verfahren des Ausbreitens des Reagenz, wie vorstehend beschrieben und wie weiter im einzelnen im folgenden beschrieben. Wenn ein wäßriges Standard-Färbereagenz auf einen Glasobjektträger getropft wird, neigt das Reagenz dazu, an dem Ort zu bleiben, wo es aufgetropft ist, anstatt daß es sich über die gesamte Oberfläche des Objektträgers verbreitet. Da der Ort des Gewebepräparats auf einem Objektträger unterschiedlich ist und von Objektträger zu Objektträger nicht an demselben Ort liegt, mußte bei früheren automatisierten Vorgängen das Reagenz über die gesamte Fläche des Objektträgers aufgebracht werden. Obwohl dieses durchgeführt werden könnte, indem eine relativ große Menge eines gelösten Reagenz aufgebracht wurde, erlauben nicht alle Einfärbevorgänge die Verwendung eines gelösten Reagenz und einige Einfärbemittel sind so teuer, daß das Aufbringen von

13.07.99

konzentriertem Reagenz auf den gesamten Objektträger, einschließlich der Flächen, wo kein Gewebe vorhanden ist, ein Hauptkostenfaktor des Vorganges wäre. Demgemäß wurde ein spezielles Aufbringsystem zur Verwendung in dem Apparat gemäß der vorliegenden Erfindung geschaffen, dieses System kann im allgemeinen auf die hier beschriebene Art und Weise auch für eine andere automatisierte Ausrüstung verwendet werden.

Der Objektträger, auf welchen das Einfärbemittel aufgebracht wird, wird zuerst mit einer wäßrigen Waschlösung gewaschen, üblicherweise einem Puffer, der ein oder mehrere Tenside enthält, die die Oberflächenspannung von Wasser verringern. Es ist jedoch nicht zufriedenstellend, nur einen Objektträger mit einer wäßrigen Lösung eines Tensids zu überfluten, da ein konzentriertes Reagenz, welches auf den Objektträger aufgebracht wird, nur auf dem Objektträger verdünnt wird. Demgemäß ist die Wasch-/Blasspitze gemäß der Erfindung so gestaltet, daß überschüssiger Puffer von den gewaschenen Objektträgern abgeblasen werden kann, um einen dünnen Film einer wäßrigen Lösung zu erzeugen. Die Höhe des Wasch-/Blasspitzenschlitzausgangs über dem Mikroskopobjektträger, der Druck der Druckluft, die durch die Spitze ausgeblasen wird, und die Bewegungsgeschwindigkeit der Spitze sind so gewählt, daß eine kontrollierte Menge Puffer auf dem Objektträger verbleibt. Wenn zu viel Puffer bleibt, werden die Reagenzien, wie vorstehend erörtert, verdünnt und werden nicht korrekt arbeiten. Wenn zu wenig Puffer übrig bleibt, wird der Puffer vor dem Aufbringen von Reagenz verdampfen und die Reagenzien werden sich nicht ausbreiten. Spezifische Techniken für das Steuern der Wasch-/Blasspitze zum Auswählen der Puffermenge sind im folgenden beschrieben.

Zusätzlich zu dem Puffer und zur Verwendung der Wasch-/Blasspitze, wie vorstehend beschrieben, schafft das Verfahren gemäß der Erfindung auch ein Ausgeben der Reagenzien

13.07.99

auf den Objektträger in einem Muster, welches das Ausbreiten unterstützt. Ein Muster ist so gewählt, daß das Reagenz durch den Oberflächenfilm nicht über einen großen Abstand diffundieren muß; beispielsweise kann ein gewundenes Aufbringmuster gewählt werden, so daß das Reagenz nicht mehr als ein Viertel (oder irgendein anderer Bruchteil) der Breite des Mikroskopobjektträgers diffundieren muß. Die Kombination aus Pufferfilm und Aufbringmuster (üblicherweise tropfenförmig oder als ein Strom) stellt ein adäquates Abdecken des Objektträgers ungeachtet des Ortes des Gewebes sicher und ermöglicht, daß weniger Reagenz verwendet wird als dies bei Abwesenheit eines Oberflächenfilms erforderlich wäre. Bei einem typischen Vorgang ist die zugesetzte Reagenzmenge weniger als diejenige, welche erforderlich wäre, um den Objektträger abzudecken, wenn auf dem Objektträger kein wäßriger Film vorhanden wäre.

Zusätzlich zu diesen allgemeinen Vorgängen und Komponenten der Erfindung kann der Apparat gemäß der Erfindung zusätzliche Untersysteme, falls erforderlich, enthalten, wie beispielsweise Tropfpfannen, Heizblöcke und andere Komponenten, die weiter unten im einzelnen beschrieben sind.

Die nunmehr allgemein beschriebene Erfindung wird anhand der Figuren unter Verwendung gleicher Bezugsziffern für identische Teile, die in unterschiedlichen Ansichten der gleichen Ausführungsform erscheinen oder Teile in unterschiedlichen Ausführungsformen, die identische Funktionen haben, verwendet, beschrieben.

Fig. 1 zeigt eine erste Ausführungsform der Erfindung in einer Draufsicht von oben. Um den bewegbaren Arm und andere Funktionsteile des Apparates sichtbar zu machen, ist die Fig. 1 ohne die übliche Abdeckung dargestellt, die normalerweise die Oberseite des Apparates bilden würde und mit den übrigen Wänden dazu dient, die Funktionsteile und Mikroskopobjektträger zu umschließen. In dieser Ansicht ist

13.07.99

die Vorderseite des Apparates 10 an der Unterseite der Figur.

In dieser Ansicht ist der bewegbare Arm 30 in der oberen linken Ecke (hinten links, horizontal gesehen) im Inneren des Halterrahmens 20 zu sehen. Der Halterahmen 20 ist aus verschiedenen Komponenten, wie beispielsweise der Basisplatte 22 und Seitenplatten 24, gebildet, die eine Kabine bilden, welche die Funktionsteile des Apparates 10 umgibt. Die verschiedenen Orte (und entsprechenden Teile des Apparates oder Materialien, welche in den Apparat an diesen Orten eingesetzt werden) sind auf der Basisplatte 22 sichtbar. Der bewegbare Arm 30 wird die Vorgänge des Apparates durchführen und ist in seiner Ausgangsposition in der rückwärtigen linken Ecke des Apparates zu sehen (oberer linker Teil in Fig. 1). Etwas vor und rechts von der Arm-Ausgangsposition befindet sich ein Entwässerungsraum 26, der einfach ein Behälter ist, in welchen die Pipettenspitzen 90 (später beschrieben) geworfen werden. Der Entwässerungsraum 26 kann mit einer Entwässerungsleitung zu einem Abfallbehälter versehen sein und ist auf jeden Fall aus seinem Standardort zum Wegwerfen der Spitzen (und wahlweisen Abziehen von gesammeltem Fluid) herausnehmbar. Dieser und andere Teile des Apparats sind so ausgebildet, daß sie an einem speziellen Ort auf der Basisplatte 22 gehalten werden können, indem ineinander passende Vorsprünge und Aussparungen oder andere Mittel zum Anordnen des angegebenen Apparateils auf der Basisplatte an einem feststehenden Ort vorgesehen sind.

Direkt vor dem Entwässerungsraum 26 befindet sich bei dieser ersten Ausführungsform der feststehende Ort für den Reagenz-Applikationsspitzenhalter 100 (in dieser Ansicht nicht sichtbar). Bei dieser ersten Ausführungsform ist der Halter 100 so ausgebildet, daß er eine Standard-Pipettenspitzenbox 92, die ein Feld von Einwegpipettenspitzen 90 enthält, halten kann. Ein Beispiel für einen geeigneten

Halter 100 für Pipettenspitzen 90 (tatsächlich für die Spitzenbox 92) ist ein erhabener Teil auf der Basisplatte 22, um welchen die Basis der Pipettenbox 92 gut paßt.

Rechts von der Pipettenspitzenbox 92 befindet sich ein Reagenzbehälterhalter 120, bei dieser Ausführungsform in Form eines Reagenzgestells. Das Reagenzgestell 120 kann entweder an der Basisplatte 22 befestigt sein oder es kann auf die vorstehend beschriebene Art und Weise so ausgebildet sein, daß es von der Basisplatte entfernbar ist, um die Reagenzbehälter 110 an einem bequemerem Ort zu laden. Das Reagenzgestell ist so ausgebildet, daß es von der Basisplatte an einem feststehenden Ort und in einer feststehenden Richtung gehalten wird, so daß jeder vorgegebene Reagenzbehälter immer in der gleichen Relativposition auf der Basisplatte 22 sein wird.

Direkt hinter dem Reagenzgestell 120 ist eine Wasch-/Blasspitze 70 und ihr Halter 80. Unterhalb des Halters 80 befindet sich eine Tropfpfanne 28, die an einen externen Abfluß angeschlossen sein kann oder nur herausnehmbar ausgebildet ist, um die Waschflüssigkeiten, die von der Spitze 70 abtropfen können, wenn diese in ihrem Halter 80 vorhanden ist, zu entfernen.

Rechts vom Wasch-/Blassspitzenhalter 80 und dem Reagenzgestell 120 befinden sich vier 10-Wannen-Mikroskopobjektträgertröge 140. Jeder Trog 140 ist an einem feststehenden Ort und in einer feststehenden Ausrichtung, bezogen auf die Basisplatte 22, und den Rest des Rahmens gehalten, so daß jeder Mikroskopobjektträger, der in einer Wanne gehalten ist, sich an einem feststehenden Ort, bezogen auf die Basisplatte 22, befindet. Durch die offenen Bodenflächen der Wannen der Tröge 140 sind Heizblöcke 200 und Tropfpfannen 210 zu sehen; diese Komponenten werden in späteren Figuren im einzelnen beschrieben.

13.07.99

Der bewegbare Arm 30 wird zu unterschiedlichen Orten über der Basisplatte 22 durch die Wirkung unterschiedlicher Motoren bewegt, die kombiniert mit den Gleitschienen arbeiten, um den Arm 30 präzise an seinem gewünschten Ort innerhalb des Rahmens 20 zu positionieren, um die hier beschriebenen Vorgänge durchzuführen. In der Figur ist an der Oberseite der Figur die X-Achsenschiene 32 sichtbar, bei dieser Ausführungsform ist die X-Achse die längere Horizontal-Hauptachse des Apparates. In der Figur ist eine einzige X-Achsenschiene 32 gezeigt, die an beiden Enden auf Lagerwellen und -bügeln 34a (linker Bügel) und 34b (rechter Bügel und Welle) gelagert ist. Die Y-Achse ist die kürzere horizontale Hauptachse der gezeigten Ausführungsform. Bei diesen Ausführungsformen wird ein Schrittmotor unter Steuerung des Computers oder eines anderen Steuergerätes (später beschrieben) verwendet. Ein Teil einer Motorhalterung 33' für den X-Achsenmotor 33 ist in dieser Figur zu sehen. Die Lagerwellen 34' und Lagerhalterungen 34' sind ebenfalls als Teil der Y-Achsenschiene sichtbar. Die Z-Achse bei dieser Ausführungsform ist die orthogonale Vertikalachse und liegt rechtwinklig zur Zeichenebene der Fig. 1.

In einer bevorzugt arbeitenden Ausführungsform, wären flexible Elektronikleitungen und Leitungen (Luft- und Flüssigkeitszuführleitungen) in dieser Figur sichtbar, die von dem bewegbaren Arm 30 zu geeigneten Fluidvorratsbehältern oder elektronischer Steuerausrüstung führen würden. Diese Leitungen sind in der Fig. 1 der Klarheit wegen nicht gezeigt, aber sie werden später anhand der spezifischen Teile des Apparates beschrieben. Diese Zuführleitungen sind ausreichend lang und flexibel, um den bewegbaren Arm 30 in die Lage zu versetzen, daß er einen leichten Zugang zu jedem Ort innerhalb des Betriebsraumes hat, der erforderlich ist, um die Vorgänge des Apparates auszuführen. Die verschiedenen Zuführleitungen werden üblicherweise im oberen Teil des Innenraums des Halterahmens 20 gehalten, typischerweise unter Verwendung eines elastischen Haltebügels, der an den



13.07.99

Zuführleitungen und an unterschiedlichen Orten des Halterahmens befestigt ist.

Die gleiche Ausführungsform 10 gemäß Fig. 1 ist in der Fig. 2 gezeigt. In dieser Vorderansicht der ersten Ausführungsform der Erfindung ist der bewegbare Arm 30 an vier unterschiedlichen Orten gezeigt (das heißt Fig. 2 zeigt nicht vier separate bewegbare Arme, sondern nur vier Orte für einen einzigen Arm). Die am weitesten links liegende Position des Arms 30 ist einfach die Ausgangsposition, in welche der Arm zurückkehrt, wenn er nicht gebraucht wird, und die so gewählt ist, daß sie ein Minimum an Störungen mit anderen Vorgängen verursacht, wie beispielsweise Einsetzen der Mikroskopobjektträger oder Wegwerfpipettenspitzen in das kabinenartige Innere des Rahmens 20. Die zweite Position des Rahmens 30, die in der Fig. 2 gezeigt ist, ist der Ort zum Aufnehmen der auswechselbaren Wasch-/Blasspitze 70, die in ihrem Wasch-/Blassspitzenhalter 80 an einem festliegenden Ort am Halterahmen 20 gehalten wird. Der Doppelpfeil auf der Z-Schiene 36 zeigt an, daß der bewegbare Arm 30 an diesem Ort nach unten bewegt wird, so daß der hohle Spitzenkopf 40 in den Stiel des Wasch-/Blaskopfes 70 eingesetzt wird. Der Wasch-/Blassspitzenhalter 80 ist so ausgebildet, daß er die Wasch-/Blasspitze 70 umgibt und hält, so daß eine Aufwärtsbewegung des Armes den Spitzenkopf 40 von der Spitze 70 entfernt, wenn die Spitze in ihrer normalen Ruheposition ist. Die Vorderseite des Wasch-/Blassspitzenhalters 80 ist jedoch offen, so daß eine Nachvornebewegung des Arms 30 die Spitze 70 von Halter 80 löst.

Nachdem die Wasch-/Blasspitze 70 nach vorne bewegt worden ist und aus ihrem Halter 80 gelöst worden ist, wird der bewegbare Arm 30 nach oben bewegt, so daß die Spitze 70 oberhalb jedes störenden Teils des Apparates ist, und die Wasch-/Blasspitze 70 wird an einen geeigneten Ort bewegt, während die Spitze in der angehobenen Position ist, wie dies in der dritten Position des bewegbaren Arms mit einem

13.07.99

Doppelpfeil auf der Z-Schiene 36 dargestellt ist. Wenn der bewegbare Arm den geeigneten Ort oberhalb eines vorgewählten Mikroskopobjektträgers erreicht, wie dies in der vierten Position des bewegbaren Arms 30 dargestellt ist, wird der Arm wieder abgesenkt, um die Wasch-/Blasspitze auf einer geeigneten Höhe oberhalb des gewählten Mikroskopobjektträgers zu positionieren. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist die Spitze 70 an einem Ende (beispielsweise dem vorderen Ende) des Mikroskopobjektträgers 130 positioniert und ein Puffer oder eine Waschflüssigkeit wird über die Flüssigkeitszuführleitung 62 (in dieser Figur nicht sichtbar; siehe Fig. 12) zugeführt, wenn die Spitze 70 in einem einzelnen Lauf zu der Rückseite des Mikroskopobjektträgers 130 bewegt wird. Falls gewünscht, kann der Blastrockenvorgang dann an dem selben Objektträger durchgeführt werden, indem über eine Luftzuführleitung Druckluft zugeführt wird, wenn die Spitze 70 in die vordere Position des Mikroskopobjektträgers 130 zurück bewegt wird. Es ist jedoch auch möglich und bei einigen Ausführungsformen vorzuziehen, die Spitze 70 zu einem zweiten Mikroskopobjektträger zu bewegen, um Puffer zuzusetzen, so daß der Puffer, der dem ersten Mikroskopobjektträger zugesetzt ist, auf dem Objektträger für eine vorgewählte Zeitspanne vor dem Entfernen verbleiben kann. Nachdem Puffer einer vorgewählten Anzahl von Objektträgern zugesetzt worden ist, wird der bewegbare Arm 30 zu dem ersten Objektträger der Gruppe rückgeführt und der Blasvorgang kann beginnen.

Nach Beendigung eines Waschzyklus auf die beschriebene Art und Weise, wird der bewegbare Arm 30 in die Aufnahmeposition zurückgeführt, die an dem zweiten Ort des bewegbaren Arms gezeigt ist, und die Wasch-/Blasspitze 70 wird von dem Hohlspitzenkopf 40 entfernt, indem der Arm 30 auf die geeignete Höhe vor dem Wasch-/Blassspitzenhalter 80 abgesenkt wird, die Wasch-/Blasspitze 70 im Halter 80 bewegt wird und der Arm 30 so angehoben wird, daß die Spitze 70 im Halter 80 zurückgehalten wird. Der bewegbare Arm 30 steht dann für

13.07.99

andere Vorgänge, wie im folgenden beschrieben, zur Verfügung.

Der Halter 80 ist so ausgebildet, daß er die Spitze 70 eng in einer einzigen, feststehenden Position hält. Obwohl dies auf verschiedene Art und Weisen durchgeführt werden kann, zeigen die Fig. 1 und 2 eine Ausführungsform, bei der der Hals der Spitze 70 (siehe Fig. 6 für detaillierte Ansichten der Wasch-/Blasspitze 70) eng in einem Preßpassungssegment gehalten ist, das den oberen Teil des Halters 80 bildet. Das Preßpassungssegment hält den Stiel der Spitze 70 eng umfaßt und verhindert, daß er in Richtung nach oben entfernt wird, erlaubt jedoch ein Herausnehmen in einer Richtung nach vorne. Auf diese Art und Weise kann der bewegbare Arm 30 zum Halter 80 zurückkehren und stellt immer den Stiel der Spitze 70 zur weiteren Aufnahme und zur weiteren Verwendung zur Verfügung.

Fig. 3 ist eine weitere Vorderansicht derselben Ausführungsform wie in den Fig. 1 und 2 gezeigt, in welcher wiederum der bewegbar Arm an mehreren Orten dargestellt ist, um die Positionierung des einzelnen bewegbaren Armes für unterschiedliche Reagenzaufbringvorgänge zu zeigen. Wiederum und wie in der Fig. 2 gezeigt, ist die am weitesten links liegende Position die Ausgangsposition des Arms 30. Die zweite Position zeigt den Arm 30 an einem Ort oberhalb einer Pipettenspitze 90 in einer Standard-Pipettenspitzenbox 92, die auf der Basis 100 positioniert ist (Reagenzaufbring-Spitzenhalter). Das Absenken des bewegbaren Armes 30 drückt den Hohlspitzenkopf 40 in eine Reagenzaufbringspitze 90 (hier eine Wegwerfpipettenspitze), wobei die Pipettenspitze an einem Hohlspitzenkopf 40 durch eine Preßfassung auf die gleiche Art und Weise gehalten wird, wie Spitzen derzeit an handbetätigten Mehrfachpipetten verwendet werden. Der bewegbare Arm 30 wird dann angehoben und in die dritte Armposition, die in der Fig. 3 gezeigt ist, bewegt, in welcher die Pipettenspitze in einen Reagenzbehälter 110

abgesenkt wird, der an einem festen Ort durch einen Reagenzbehälterhalter 120 gehalten ist. Durch Zuführen von negativem Druck durch die Pipettenspitze wird Reagenz in die Wegwerfpipettenspitze 90 eingesogen, um auf die passenden Mikroskopobjektträger aufgebracht zu werden. Ein abgemessenes Volumen des Reagenz wird angesogen, indem der Hohlspitze 40 ein Luftunterdruck zugeführt wird (das heißt es wird durch die Hohlspitze 40 Luft angesogen). Obwohl ein Apparat gemäß der Erfindung ein Element aufweisen kann, das speziell für diesen Vorgang konzipiert ist, verwendet die Ausführungsform, die in den Fig. 1 bis 3 gezeigt ist, ein Standard-Flüssigkeitsausgabesystem und die Flüssigkeit, welche sich in der Zuführleitung befindet, wirkt als ein Kolben zum Ansaugen eines spezifischen Volumens Luft und somit Ansaugen spezifischer Volumina von Reagenz in die Reagenzspitze 90. Dieser Teil des Apparates ist im einzelnen in Fig. 12 gezeigt. Die Reagenzspitze 90 wird dann, wie zuvor angehoben und wie dargestellt, in die vierte Kopfposition in angehobenem Zustand an einen passenden Ort oberhalb eines vorgewählten Mikroskopobjektträgers bewegt. An der vorgewählten Position, die als fünfte Position des bewegbaren Arms 30 dargestellt ist, wird die Reagenzspitze 90 abgesenkt und Reagenz wird auf den Objektträger wiederum unter Verwendung des kommerziellen Flüssigkeitsabgabesystems, wie in der Fig. 12 gezeigt, aufgebracht und die in der Zuführleitung befindliche Flüssigkeit wirkt als ein Kolben. Reagenz kann auf einen einzelnen Mikroskopobjektträger 130 aufgebracht werden oder kleine Menge des Reagenz in der Spitze 90 können auf unterschiedliche Mikroskopobjektträger aufgebracht werden.

Nachdem das Reagenz dem letzten Objektträger zugesetzt worden ist, wird der bewegbare Arm 30 in eine Position oberhalb des Entwässerungsraums 26 rückgeführt und ein Hubmagnet, der an dem bewegbaren Arm 30 angeordnet ist, läßt die Reagenzspitze 90 in den Entwässerungsraum 26 für eine spä-

13.07.99

tere Entfernung frei. Die Funktionsweise des Hubmagneten wird in späteren Figuren beschrieben.

Nach dem Wegwerfen der Reagenzaufbringspitze 90 steht der Hohlspitzenkopf 40 wieder für weitere Vorgänge zur Verfügung.

Fig. 4 ist eine Reihe von drei Ansichten des bewegbaren Arms 30. In der Draufsicht wird der Arm 30 etwas durch die X-Achsenchiene 32 versperrt. Ein Teil des Arms 30, der an der Unterseite der Draufsicht sichtbar ist, hat jedoch einen Hubmagneten 42, der für das Wegwerfen der Spitze verwendet wird.

In der Vorderansicht der Fig. 4 sind die Z-Schiene 36 und der Z-Schieber 38 zu sehen, der entlang der Schiene 36 unter Steuerung des Z-Achsenmotors 39 fährt, der in der Seitenansicht der Fig. 4C sichtbar ist. Die Seitenansicht 4C zeigt auch den X-Achsenmotor 41, zusammen mit der X-Schiene 32.

Die Funktionsweise des Spitzenfreigabe-Hubmagneten 42 ist aus der Seitenansicht der Fig. 4 am besten zu ersehen, da die Aktivierung des Hubmagneten bewirkt, daß das Schieberelement 43 nach unten bewegt wird, wodurch eine gehaltene Spitze vom Ende des Spitzenkopfes 40 weggedrückt wird. Der Schieber 43 kehrt dann in seine Normalposition (wie in dieser Figur gezeigt) zurück, so daß eine weitere Spitze am Spitzenkopf 40 plaziert werden kann.

Fig. 5 zeigt drei Ansichten des bewegbaren Arms 30, wobei die mittlere Ansicht den Hohlspitzenkopf 40 ohne am Kopf präsente Spitze zeigt. In der gezeigten Ausführungsform hat der Spitzenkopf 40 drei unterschiedliche Durchmesser an unterschiedlichen Orten, nämlich ein Segment 40a, das ausreichend groß ist, um als ein Anschlag zu dienen, wenn eine Reagenzspitze 90 am Spitzenkopf 40 durch eine Preßpassung

13.07.99

befestigt wird, einen mittleren Abschnitt 40b, der als Preßpassungsort für die Reagenzaufbringspitze 90 wirkt, und ein Segment 40c mit kleinerem Durchmesser am Ende des Spitzenkopfes 40, das so bemessen ist, daß es mit der Wasch-/Blasspitze zusammenpaßt. Somit wird, wie in der am weitesten rechts liegenden Ansicht des Armes 30 in Fig. 5 gezeigt, der Hohlspitzenkopf 40 nur so weit wie das Segment 40c in die Wasch-/Blasspitze 70 eingesetzt, während die am weitesten links liegende Ansicht in der Fig. 5 den Hohlspitzenkopf 40 in eine Wegwerfpipettenspitze 90 so weit als die Teilungslinie zwischen Segment 40a und 40b liegt, eingesetzt ist. Somit wird die Reagenzaufbringspitze 90 herausgeworfen, wenn der Hubmagnet 42 den Hohlspitzenkopf 40 soweit nach unten wie das Segment 40b bewegt, wobei der Hubmagnetgleitring (in dieser Ansicht nicht sichtbar) einfach die Pipettenspitze 90 vom Ende des Hohlspitzenkopfes 40 abtritt. Der Hubmagnet 42 wird nicht dazu verwendet, den Wasch-/Blaskopf 70 zu entfernen, da das Entfernen einer wieder verwendbaren Spitze auf diese Art und Weise kein leichtes Aufnehmen zuläßt. Statt dessen wird die wieder verwendbare Spitze 70 durch Einsetzen in einen Halter, wie vorstehend beschrieben, herausgenommen. Bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird der Hubmagnet-Lösemechanismus, wie vorstehend beschrieben, im allgemeinen für Einwegspitzen verwendet, während die Preßpassung und der spezifisch gestaltete Halter für wieder verwendbare Spitzen verwendet wird, so daß solche Spitzen für weitere Verwendung in einer sauberen Ausrichtung gehalten werden.

Fig. 6 zeigt eine Reihe von drei detaillierten Ansichten der Wasch-/Blasspitze 70. In der Vorderansicht der Fig. 6 werden durchgezogene Linien dazu verwendet, die Außenflächen anzugeben und gestrichelte Linien werden dazu verwendet, die innen liegenden Flächen anzugeben.

In der Seitenansicht im Schnitt gemäß Fig. 6A ist der Innenhohlraum des Spitzenkopfes 70 sichtbar sowie die Ausbil-

13.07.99

derung des Spitzenkopfes 70 aus drei Teilen. Vorzugsweise ist der Spitzenkopf aus wenigstens zwei Teilen gebildet, so daß der Innenhohlraum für Reinigung zugänglich ist. Bei der in der Fig. 6 gezeigten Ausführungsform sind drei Teile vorhanden: ein Stiel 72, ein Kopf 74 und ein Preßpassungsverbindungsstück 76. Der Stiel 72 ist speziell so ausgebildet, daß er lösbar vom Halter 80 gehalten werden kann, wie dies vorstehend beschrieben ist. An der Oberseite des Stiels 72 ist eine vorstehende Rippe 73 vorgesehen, die in Kombination mit dem Kopf 74 dazu dient, als oberer bzw. unterer Anschlag zu dienen, wenn der Stiel 72 in den Halter 80 gepreßt wird, wie dies vorstehend bei der Beschreibung der Funktionsweise der Wasch-/Blasspitze anhand der Fig. 2 beschrieben worden ist.

Der Innenhohlraum der Spitze 70 ist nicht auf die dargestellte spezifische Form begrenzt, obwohl gewisse Vorteile im Hinblick auf Aspekte dieses Innenraums und der Schlitzform, wie im folgenden beschrieben, erzielt werden. Im allgemeinen kann der Innenhohlraum 77 des Kopfes signifikant bezüglich seiner Form variieren, solange ein ausreichender Zugang für leichtes Strömen von Fluid in den Innenraum 77 geschaffen ist, so daß sich keine Druckunterschiede aufbauen und einen unterschiedlichen Ausgang von Luft oder Flüssigkeit durch den Ausgangsschlitz 79 verursachen. Der Ausgangsschlitz 79 ist im allgemeinen an der am weitesten unten liegenden Fläche der Spitze 70 gelegen und ist vorzugsweise ein linearer Ausgangsschlitz mit einer Länge im wesentlichen gleich der Breite eines Standard-Mikroskopobjektträgers des Typs, der für die Verwendung für eine vorgegebene Zeit ausgewählt worden ist. Da es unterschiedliche Größen von Mikroskopobjektträgern gibt, können unterschiedliche Wasch-/Blasspitzen 70 für jeden dieser Mikroskopobjektträger hergestellt werden.

Wie in der Seitenansicht im Schnitt in der Fig. 6 gezeigt, ist die Bahn 78 zwischen Innenhohlraum 77 und Ausgangs-

schlitz 79 vorzugsweise so vorgesehen, daß der Luftausgangsschlitz 79 in einem Winkel zur Vertikalen austritt. Durch Vorsehen des Luftausgangsschlitzes 79 in einem Winkel und Bewegen des Kopfes in einer Richtung auf den stumpfen Winkel zu, der zwischen der Luftwand und dem Mikroskopobjektträger gebildet ist, wird das Entfernen von Wasser oder Puffer vom Objektträger begünstigt.

Fig. 7 zeigt mehrere typische Reagenzausgabemuster auf einen Mikroskopobjektträger. Die meisten Objektträger haben eine Probenfläche 132 und eine Fläche zum Schreiben von Information auf den Objektträger 134. Wegen der Art des Aufbringvorgangs von Proben auf die Objektträger kann eine Gewebeprobe an irgendeinem Ort auf der Fläche 132 vorhanden sein. Wie vorstehend erörtert, trägt der dünne Film aus Puffer, der vorhanden ist, wenn Einfärbereagenz auf den Objektträger aufgebracht wird, dazu bei, sicherzustellen, daß Reagenz adäquat der Gewebeprobe zugesetzt wird, ungeachtet davon, wo die Probe liegt oder das Reagenz aufgebracht wird. Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Apparates und des Verfahrens wird jedoch das Reagenz in einem Muster anstatt einem einzigen Ort ausgegeben, so daß der Abstand, den ein Reagenz durch den Flüssigkeitsfilm diffundieren muß, verringert ist. Mehrere typische Reagenzausgabemuster sind dargestellt, obwohl andere Muster gleichermaßen geeignet sein können.

Obwohl viele Einfärbeporgänge durchgeführt werden können, ohne daß die Objektträger erhitzt werden, können einige Einfärbetechniken verbessert werden, indem Wärme zugeführt wird, so daß entweder die Inkubationszeit oder die Trockenzeiten verkürzt sind, wodurch die Geschwindigkeit des Gesamtvorganges erhöht wird. Für das Erwärmen von Mikroskopobjektträgern existieren zahlreiche Techniken und können an den vorliegenden Apparat angepaßt werden. Eine bevorzugte Ausführungsform einer derartigen Heizvorrichtung in Kombination mit einem Mikroskopobjektträgerhalter, der einen



13.07.99

auswechselbaren Trog für mehrere Mikroskopobjektträger hat, ist, beginnend mit Fig. 8, dargestellt. Diese Figur zeigt sechs Ansichten eines Troges 190, der zehn Standard-Mikroskopobjektträger mit 2,5 x 7,5 cm (1" x 3") tragen kann. Der Trog 190 ist in Form einer Reihe von einzelnen Wannen 192 für Mikroskopobjektträger ausgebildet; der Ort eines Einzel-Mikroskopobjektträgers 130 ist in der am weitesten rechts liegenden Wanne der Draufsicht gemäß Fig. 8 mit gestrichelter Linie dargestellt. Aus Gründen, die später ersichtlich werden, ist der Boden der einzelnen Wannen offen; diese Öffnung wird ermöglichen, daß die Oberfläche eines Heizblocks direkt den Boden jedes Mikroskopobjektträgers berührt. Einzelne Seitenwände 194 trennen jede Wanne 192 gegenüber ihrer benachbarten Wanne, um einen zufälligen Kontakt mit Flüssigkeit zu verhindern (wie dies während eines Waschvorgangs auftreten kann). Der offene Boden der Wannen 192 erlaubt auch, daß Puffer durch die Unterseite des Troges 190 abfließt, wo er abgeleitet wird, typischerweise durch eine Abzugpfanne, die in späteren Figuren dargestellt wird. Die Seitenwände und die Haltelappen 196 halten die Mikroskopobjektträger eng in ihren einzelnen Wannen plziert. An einem Ende der Wanne ist ein Spalt 198 vorhanden, um ein leichtes Vergreifen eines einzelnen Mikroskopobjektträgers zwischen Daumen und Zeigefinger zum Einsetzen in den Trog und Herausnehmen aus dem Trog 190 zuzulassen.

Herausnehmbare Tröge 190 sind zur Erleichterung des Betriebes gestaltet, indem sie einen Benutzer in die Lage versetzen, die Mikroskopobjektträger in einen Ladetrog außerhalb der Kabine, in welcher die Einfärbevorgänge erfolgen, plazieren kann. Der Trog paßt auch genau in die anderen Elemente an dem passenden Ort auf der Basisplatte 22. Es sind jedoch andere Ausführungsformen möglich, wie beispielsweise Ausführungsformen, bei denen Mikroskopobjektträger direkt in Permanentwannen plziert werden, die innerhalb des Halterahmens des Apparates liegen.

13.07.99

Ein einzelner Heizblock, der mit dem Trog zu verwenden ist, ist in der Fig. 9 gezeigt. Es sind zwei Ansichten gezeigt, nämlich eine Draufsicht 9A und eine Schnittansicht 9B. Wie am klarsten aus der Schnittansicht zu ersehen ist, ist die Oberfläche des Heizblocks 200 in eine Anzahl von erhabenen Teilen 202 und Vertiefungen 204 unterteilt. Die Vertiefungen 204 sind so bemessen, daß sie genau auf die Unterkanten des Trägertroges 190 für die Objektträger passen. Wenn die Unterkanten des Troges 190 in diesen Vertiefungen plaziert sind, drücken die erhabenen Teile 202 nach oben in die offenen Unterseiten der Wannen des Troges und gelangen in engen Kontakt mit den einzelnen Mikroskopobjektträgern, wobei sie auch dazu dienen, den Trog 190 präzise zum Ort des Heizblockes 200 zu plazieren.

Jeder der einzelnen Heizblöcke 200, wie in der Fig. 9 gezeigt, kann zu einem Feld Mehrfachblöcke, wie in der Fig. 10 gezeigt, unter Verwendung von Montageblöcken 206 und 207 zusammengebaut sein. Es ist dann möglich, jeden der Heizblöcke individuell auf unterschiedliche Temperaturen zu heizen, wodurch gleichzeitig unterschiedliche Betriebstemperaturen für unterschiedliche Reagenzkonfigurationen ohne Intervention der Bedienungsperson geschaffen werden können. Bei der in der Fig. 1 gezeigten Ausführungsform wird jeder der einzelnen Heizblöcke zum Zweck einer leichten Temperatursteuerung elektrisch geheizt.

Die Heizblockbaugruppen können auf einer Entwässerungswanne montiert werden, die für das Entfernen von Waschfluid bereit ist. Fig. 11 zeigt in einer Draufsicht und einer Seitenansicht im Schnitt die in der Fig. 10 gezeigte Heizblockbaugruppe, die auf einer Entwässerungspfanne 205 montiert ist, und vier Mikroskopobjektträgertröge 190 trägt, von denen jeder zehn Objektträger enthalten kann für insgesamt 40 Mikroskopobjektträger in einem feststehenden Feld. Die Seiten des Mikroskopobjektträgertroges 190 verhindern eine Kontamination zwischen benachbarten Mikroskopobjekt-

trägern und der offene Boden des Troges 190 und der Raum zwischen den einzelnen Heizblöcken 200 ermöglicht eine Bereitschaft zum Abziehen von Waschfluid von den einzelnen Mikroskopobjektträgern.

Fig. 12 zeigt in drei Ansichten verschiedene Komponenten, die bei der Zufuhr von Luft und Waschflüssigkeit zum Kopf 30 verwendet werden. Obwohl Luft durch einen Druckluftbehälter und Regler zugeführt werden kann, versorgt bei der in der Fig. 1 gezeigten Ausführungsform ein Kompressor 170 (und ein Ausgleichsvorratsbehälter) für Luft durch die flexible Leitung 172 zum bewegbaren Arm 30 und letztlich zur Hohlspitze 40. In dieser Leitung ist ein Luftabschaltventil 174 gelegen und wird durch eine Steuerungseinrichtung 150 (in dieser Figur nicht sichtbar) gesteuert. Puffer oder Waschlösung wird durch eine Komponente zugeführt, die eine Lieferung von abgemessenen Flüssigkeitsvolumina ermöglicht, wie beispielsweise eine kommerziell erhältliche, elektrisch betätigte automatische Ausgabepipette. Der Puffer in einem Vorratsbehälter 182 wird durch die Zuführleitung 184 der Verdünnungsvorrichtung 180 zugeführt und dann durch die Zuführleitung 186 zu dem bewegbaren Kopf 30 und letztendlich zu der Hohlspitze 40 zugeführt. Die in der Ausführungsform gezeigte Verdünnungsvorrichtung 180 wirkt als ein Abschaltventil (shut-off valve), so daß keine weitere Ventilausstattung erforderlich ist. Zusätzlich ist die Flüssigkeit, welche in der Leitung 186 vorhanden ist, im wesentlichen unelastisch und wirkt als ein Kolben zum Ansaugen oder Ausgeben von abgemessenen Volumina von Luft durch die Hohlspitze 40. Während eines Waschvorganges, wie vorstehend beschrieben, sind beispielsweise sowohl die Leitung 186 als auch die Hohlspitze 40 am bewegbaren Kopf mit Waschflüssigkeit gefüllt. Während des Blasvorgangs wird Luft durch das Abschaltventil 174 freigegeben und bläst Puffer aus der Hohlspitze 40. Da zu diesem Zeitpunkt die Verdünnungsvorrichtung 180 jedoch abgeschaltet ist, kann keine Flüssigkeit zwangsweise über die Leitung 186 in die Verdünnungs-

vorrichtung 180 gelangen, sondern wird in der Leitung 186 gehalten. Nach der Beendigung des Blasvorgangs und Aufnehmen einer Reagenzausgabespitze 90 auf dem Hohlspitzenkopf 40, wird der nächste Vorgang das Ansaugen von Reagenz aus einem Reagenzbehälter in die Pipettenspitze 90 sein. Selbst wenn die Menge der Flüssigkeit, die in der Leitung 186 zurückgehalten wird, etwas variabel ist, ist somit der nächste Vorgang das weitere Anziehen der Flüssigkeit in die Leitung 186 um ein präzises Maß unter Steuerung der Steuerungseinrichtung 150 und der Verdünnungsvorrichtung 180, so daß die tatsächliche Menge der Flüssigkeit, die in der Versorgungsleitung 186 vorhanden ist, bei dem Bemessungsvorgang keine Differenz erzeugt. Gleichmaßen wird bei dem Ausgeben von Reagenzteilmengen auf die einzelnen Objektträger Waschflüssigkeit nicht aus der Leitung 186 ausgestoßen, da durch die Verdünnungsvorrichtung 180 nicht mehr Flüssigkeit in die Leitung 186 rückgeführt wird, als ursprünglich angesaugt worden war. Somit wirken die Verdünnungsvorrichtung 180 und die Flüssigkeit, die in der Leitung 186 vorhanden ist, so, daß Luft mit dem gewünschten Unter- und Überdruck für das Ausgeben von Reagenz auf die einzelnen Objektträger zugeführt wird.

Wie aus dem vorstehend beschriebenen Vorgang zu ersehen ist, ist ein Ventil 188 als Teil der Verdünnungsvorrichtung 180 vorhanden, so daß die Verdünnungsvorrichtung Flüssigkeit durch die geeignete Leitung 184 oder 186 für unterschiedliche Vorgänge ansaugt und ausgibt.

Wie für den Fachmann klar zu ersehen ist, können viele der spezifischen Elemente, die in den Figuren gezeigt und vorstehend beschrieben worden sind, durch andere Elemente ersetzt werden, die die gleiche Funktion ausüben. Beispielsweise können die XYZ-Schienen durch einen einzigen Roboterarm ersetzt werden. Zusätzlich ist zu ersehen, daß die spezifischen Schienen, Motoren und anderen Einzelteile durch andere Teile mit äquivalenter Funktion ersetzt werden kön-

13.07.99

nen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wurden die XYZ-Schienen als kommerziell erhältliche Gleitschienen bezogen. Für die X-Achsen- und Z-Achsenbewegungen werden durch eine lineare Bewegungsschiene und eine lineare Bewegungsführung (Teil Nr. SR20W von THK) und einen Schrittschaltmotor (Teil Nr. 4023-819 für die X-Achse und 5017-009 für die Z-Achse, beide von Applied Motion erhältlich) gesorgt. Die zwei Schienen des Y-Achsenwellensystems sind eine Linearlagerschienenbaugruppe (Teil-Nr. SRA-8-XS) und ein Linearlagerkissenblock (Teil Nr. SPB-8-OPN-XS), beide von Thomson erhältlich; die Leistung entlang der Y-Achse wurde durch den gleichen Schrittschaltmotor zugeführt, der für die X-Achse verwendet wurde. Andere auf dem Markt erhältliche Komponenten, die bei der in den Fig. 1 bis 3 gezeigten Ausführungsform verwendet wurden, umfassen einen Inc. Modell Nr. 107CA18-Kompressor der Firma Thomson Industries, eine automatische Verdünnungsvorrichtung Cavro XL-3000 und NAC-Ventile, ein Luftabschaltventil Inc., Modell Nr. 35A-AAA-OAAA-IBA. Elektrische Verbindungen, Rohrleitungen, Druckluftverteilungssysteme, Flüssigkeitsverteilungssysteme von einem zentralen Vorratsbehälter, und viele andere Komponenten, wie beispielsweise Halter für eine Standardpipettenspitzenbox oder für Reagenzbehälter sind von einer Vielzahl von Herstellern auf dem Markt erhältlich. Somit kann der Apparat gemäß der Erfindung aus kommerziell erhältlichen Fertigteilen auf die beschriebene Art und Weise mit einem Minimum an spezifischen Herstelltechniken hergestellt und zusammengebaut sein. Da der Blastrokkopf (70 in den Figuren) nicht leicht erhältlich ist, wird er typischerweise für einen bestimmten Apparat, wie dargestellt, oder in einer ähnlichen Art und Weise hergestellt, um die Merkmale zu erzeugen, die in der vorstehenden Beschreibung beschrieben sind.

Die Zusammensetzung der Komponenten, aus denen verschiedene Teile hergestellt sind, können weit variieren, aber Komponenten, durch welche Reagenzien hindurchgehen oder die po-

13.07.99

tentiell korrodierendes Reagenz oder Waschlösungen kontaktieren, werden typischerweise aus rostfreiem Stahl oder beständigen Kunststoffen hergestellt, um Korrosion zu verhindern. Der Wasch-/Blaskopf ist typischerweise aus einem gießbaren Kunststoff (wie beispielsweise Polyacrylat), hergestellt und kann durch ein Gießverfahren, ein Kunststoff-Formverfahren oder eine Kombination der beiden in Abhängigkeit von der einzelnen Form, die von einem Benutzer gewählt worden ist, hergestellt werden. Teile, die Verschleiß ausgesetzt sind, wie beispielsweise der Stiel des Wasch-/Blaskopfes 70 und der Hohlspitzenkopf 40 sind typischerweise aus einem Hartkunststoff oder einem anderen Material, das verschleißfest ist, hergestellt.

Der Apparat wird typischerweise unter Steuerung eines Computers oder einer anderen programmierbaren Steuervorrichtung betätigt. Bei den einfachsten Anwendungen, bei denen nur ein einziger Typ von automatischem Einfärben wiederholt durchgeführt wird, ist es möglich, entweder eine fest verdrahtete Steuerungseinrichtung oder eine nicht programmierbare elektronische Steuerung, wie beispielsweise einen Computer, der nach Befehlen von einem Nur-Lese-Speicher arbeitet, vorzusehen. Bei bevorzugten Ausführungsformen wird jedoch eine programmierbare Steuervorrichtung oder ein programmierbarer Computer verwendet, so daß der Betrieb variiert werden kann. Die Software wird im allgemeinen mit dem Computer geliefert, so daß der Benutzer keine Instruktionen für individuelle Bewegungen schaffen muß, sondern nur geeignete Bewegungen aus einem Menü auswählt. In einem typischen Betrieb würde der Benutzer gefragt, um den Ort und das Volumen der Reagenzien, den Ort der zu behandelnden Objektträger und die Zeitdauer der verschiedenen Schritte, wie beispielsweise Inkubationszeiten (und falls notwendig Temperatur), zu wählen; alle anderen Vorgänge werden durch die vorprogrammierte Instruktion durchgeführt, die in dem Speicher des Computers eingestellt ist, die die tatsächliche Bewegung des bewegbaren Arms zu den passenden Orten und

die Aktivierung der verschiedenen Luft- und Flüssigkeitssteuersysteme steuert.

Ein Schlüsselschritt des Verfahrens, das in dem automatisierten Apparat gemäß der Erfindung verwendet wird, beinhaltet das Abblasen von überschüssigem Reagenz oder Puffer von der Oberfläche des Objektträgers. Eine bevorzugte Ausführungsform der Spitze, die bei diesem Blasvorgang verwendet wird, ist in der Fig. 6 gezeigt, obwohl andere Spitzen mit Schlitzen für das Austreten von Luft zum Schaffen einer Luftwand auch verwendet werden können. Durch Einstellen des Luftdruckes, der Höhe des Schlitzaustritts oberhalb des Mikroskopobjektträgers und der Bewegungsgeschwindigkeit des Schlitzes kann das Ausmaß, in welchem die Flüssigkeit von dem Objektträger entfernt wird, variiert werden. Die Flüssigkeitsmenge, die als dünner Film auf der Oberseite der Mikroskopobjektträger vorhanden ist, ist ziemlich klein, typischerweise von 2 bis 25 ml, im allgemeinen von 3 bis 20 ml und insbesondere von 5 bis 10 ml. Die zugehörige Fläche beträgt ungefähr  $15 \text{ cm}^2$  und schafft ein typisches Volumen pro Oberfläche von  $0,13$  bis  $1,7 \text{ ml/cm}^2$ . Es ist jedoch schwierig, das tatsächliche Volumen, welches verwendet wird, zu bestimmen, da der Vorgang des Abblasens von Flüssigkeit von der Oberseite eines Objektträgers bewirkt, daß Flüssigkeit an anderen Teilen des Mikroskopobjektträgers anhaftet, wodurch die Messung der verbleibenden Flüssigkeit schwierig wird. Somit wird das Volumen der Flüssigkeit, welches auf der Oberseite des Objektträgers am Ende des Blastrockenvorganges vorhanden ist, am besten empirisch bestimmt. Das maximal zulässige Volumen wird durch das Einfärbemittel bestimmt, welches verwendet wird, und dessen Konzentration in der Reagenzaufbringstufe, da diese Faktoren die Endkonzentration des Einfärbemittels oder anderen Reagenz auf der Oberfläche dieses Objektträgers beeinflussen. Historische Prozeduren, die für die Objektträgerpräparation entwickelt worden sind, werden allgemein in Begriffen, wie besondere Reagenzkonzentration, Inkubationszeit

und Temperatur beschrieben. Demgemäß ist es wünschenswert, ein Mindestvolumen an Flüssigkeit auf dem Objektträger zu schaffen, um zu vermeiden, daß eine Änderung der Reagenzkonzentration gegenüber dem in der Industrie verwendeten Standard auftritt. Durch Befolgen dieser Richtlinie ist es möglich, kommerziell erhältliche, bereits hergestellte Einfärbemittellösungen als Reagenzien zu verwenden.

Andererseits kann zu wenig Flüssigkeit auf einem Objektträger insbesondere infolge von Verdampfen bei der Reagenzausbreitung Probleme bereiten. Da Puffer einem Objektträger vor dem Zusetzen von Reagenz zugesetzt wird und die Bewegung des bewegbaren Arms zum Aufnehmen von Reagenzaufbringspitzen und Reagenzien Zeit beansprucht, muß der Puffer auf dem Objektträger bleiben, bis Reagenz zugesetzt wird, was weiterhin erst dann erfolgen kann, nachdem andere Objektträger präpariert worden sind. Da es effizienter ist, mehrere Objektträger auf einmal zu präparieren, anstatt wiederholte Bewegungen des bewegbaren Arms und wiederholte Aufnahmebewegungen für die unterschiedlichen Köpfe zu benötigen, würde ein typisches Mindestvolumen an Puffer die Menge sein, die ausreicht, um eine Präparierung der letzten vier Objektträger, ohne daß eine gegebene Spitze ausgewechselt werden muß, zu erlauben.

Der Luftdruck, die Höhe des Kopfes über dem Objektträger und die Geschwindigkeit des Kopfes zur Steuerung des Flüssigkeitsfilms kann durch den Benutzer oder durch den Hersteller des Apparates gewählt werden. Im allgemeinen wird immer der gleiche Luftdruck verwendet, um diese Variante nicht in Betracht ziehen zu müssen. Somit werden nur die Höhe des Kopfes und die Bewegungsgeschwindigkeit typischerweise variiert. Je höher die Höhe des Kopfes oberhalb des Objektträgers ist, um so weniger Flüssigkeit wird entfernt. Je schneller der Kopf über den Objektträger bei einer gegebenen Höhe gefahren wird, um so weniger Flüssigkeit wird entfernt.



13.07.99

Für einen Standard-Mikroskopobjektträger mit 2,5 x 7,5 cm (1 Inch x 3 Inch) Oberfläche und eine Wasch-/Blasspitze mit der in der Fig. 6 gezeigten Form, erzeugen ein Luftdruck von 7 psi (0,5 atm), eine Höhe von 2 mm (0,07 Inch) oberhalb der Mikroskopobjektträgeroberfläche und eine Bewegungsgeschwindigkeit von 7,5 cm/sec (3 Inch/sec) einen bevorzugten Pufferfilm, der für das Einfärben von vier Objektträgern bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 bis 80% geeignet ist, das heißt der typischen Luftfeuchtigkeit, die innerhalb eines geschlossenen und in Betrieb befindlichen Apparates gemäß der Erfindung vorhanden ist.

Die in dem Apparat gemäß der Erfindung verwendeten Waschlösungen können signifikant in Abhängigkeit von der verwendeten Einfärbetechnik variieren. Eine typische Waschlösung ist eine wäßrige Lösung eines Tensids und kann andere Komponenten enthalten, die bei der üblichen Objektträgerherstellung von Waschlösungen vorhanden sind, wie beispielsweise Puffer. Bei bevorzugten Ausführungsformen ist ausreichend Tensid vorhanden, um eine Oberflächenspannung in einer Lösung zu schaffen, die äquivalent derjenigen ist, welche in Lösungen vorhanden ist, die Wasser in den folgenden Tensiden bei den aufgelisteten Konzentrationen enthalten. Typische verwendete Tenside (mit in Klammern gezeigten Konzentrationen) sind TWEEN 20 (0,02 bis 2% v/v), BRIT 35 (0,05 bis 2% v/v) und TRITON X-100 (0,01 bis 1% v/v). Typische verwendete Puffer (mit dem pH-Wert in Klammern) sind phosphatgepufferte Saline (7,6) und TRIS-CL (7,6). Der Kürze halber wurde in der Beschreibung und in den Ansprüchen häufig von Wasser als Waschfluid oder das Fluid, welches in einem besonderen Schritt zu entfernen ist, gesprochen. Es ist klar zu ersehen, daß dieses "Wasser" im allgemeinen eine wäßrige Lösung von Puffer und Tensid oder irgendeinem Einfärbereagenz sein kann.

Es ist klar zu ersehen, daß der Apparat und das Verfahren gemäß der Erfindung bei jeder Einfärbetechnik verwendet werden können, die manuell ausgeführt werden kann, und daß es keine Begrenzungen der Erfindung durch die Einfärbetechnik gibt.

Der Apparat gemäß der Erfindung kann eine Anzahl von weiteren Komponenten aufweisen, die für die Erleichterung des Betriebes konzipiert sind. Beispielsweise können Entwässerungströge mit Ausgangsleitungen zu Abwasserbehältern entweder einzeln unter den Komponenten des Apparates oder als ein einziger Entwässerungstrog vorgesehen sein, und es kann ein Sammelsystem für den gesamten Innenraum des Geräteraumens vorgesehen sein. In einem typischen Apparat hat der Rahmen die Form einer Kabine mit einem Innenraum, in welchem alle Vorgänge stattfinden. Eine schließbare Zugangspforte (beispielsweise Tür) ist vorgesehen, um eine Bedienungsperson in die Lage zu versetzen, verschiedene austauschbare Komponenten in den Kabineninnenraum zusätzlich einzusetzen. Es kann eine transparente Tür vorgesehen sein, um ein zufälliges Versprühen von Flüssigkeit (wie beispielsweise während eines Trockenvorganges) in den Raum, in welchem der Apparat steht zu verhindern, während die Bedienungsperson des Apparats gleichzeitig in die Lage versetzt wird, den korrekten Betrieb visuell zu überprüfen. Andere wahlweise Merkmale, die in dem Apparat enthalten sein können, umfassen Vorrichtungen, die dazu dienen, den Betriebswert sicherzustellen, gegenüber elektrischem Schlag zu schützen, zu verifizieren, daß eine geeignete Spitze gewählt worden ist und sauber in dem Spitzenkopf platziert worden ist, oder um Objektträger in einem Mikroskopobjektträgertragetrog oder anderen Behälter für Mikroskopobjektträger optisch abzutasten, so daß eine menschliche Bedienungsperson nicht einmal Information in den Computer eingeben muß. Solche Information könnte beispielsweise durch einen Standard-Strichkode geliefert werden, der an einem einzelnen Mikroskopobjektträger, dem Reagenzbehälter oder einer ande-

13.07.99

ren Komponente befestigt ist. Es können mehrere Reagenzbehälter vorgesehen sein, so daß unterschiedliche Einfärbungsvorgänge unter Steuerung des Strichkodes und des Computers und dessen vorprogrammierter Software durchgeführt werden können..

13.07.99

94 929 964.8

BIOGENEX LABORATORIES

UG/gh/ml

### P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Automatischer Einfärbungsapparat (10) mit:

einem Halterahmen (20);

einem Arm (30), der in drei Dimensionalen bewegbar am Rahmen (20) befestigt ist;

Mitteln zum Bewegen des Arms;

einem am Arm angeordneten Hohlspitzenkopf (40);

Mitteln zum abwechselnden Zuführen von positivem oder negativem Gasdruck zum Hohlspitzenkopf;

einer auswechselbaren Wasch/Blas-Spitze (70) mit einem Ausgangsschlitz im wesentlichen mit einer Länge gleich der Breite des Mikroskopobjektträgers (130), wobei die Wasch/Blas-Spitze (70) so ausgebildet ist, daß sie mittels einer vorgewählten Bewegung des Arms an dem Hohlspitzenkopf (40) lösbar befestigbar ist;

einem Wasch/Blas-Spitzenhalter (80) an einem ersten feststehenden Ort am Rahmen;

einem Reagenz-Aufbringspitzenhalter (100) an einem zweiten feststehenden Ort am Rahmen zum Halten einer Reagenzaufbringspitze (90); wobei die Reagenzaufbringspitze (90) so ausgebildet ist, daß sie an dem Hohlspitzenkopf durch eine vorgewählte Bewegung des Arms (30) lösbar befestigbar ist;

einem Reagenzbehälterhalter (120) an einem dritten feststehenden Ort am Rahmen (20);

einem Mikroskopobjektträgerhalter (140) an einem vierten feststehenden Ort am Rahmen (20), wobei der Mikroskop-Objektträgerhalter so ausgebildet ist, daß er den Mikroskop-Objektträger (130) auswechselbar enthalten kann; und

einer Steuerung zum Steuern der Bewegung des Arms zwischen den Orten; so daß der Spitzenkopf (40) die Wasch/Blas-Spitze oder die Reagenzaufbringspitze (90) in Antwort auf die Bewegung des Arms (30), gesteuert durch die Steuerung, aufnimmt und an einen oder mehrere Orte bewegt, um ein Reagenz in den Reagenzbehälter aufzunehmen oder das Reagenz auf den Objektträger auszugeben oder ein Gas oder eine Flüssigkeit durch die Wasch/Blas-Spitze über dem Objektträger auszugeben.

2. Apparat nach Anspruch 1, wobei der Halterahmen (20) eine Kabine mit einem Innenraum aufweist, und alle besagten Orte in dem Innenraum angeordnet sind.

3. Apparat nach Anspruch 1, wobei die Kabine eine schließbare Zugangsöffnung hat.

4. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei der Arm (30) entlang unabhängiger X-, Y- und Z-Schienen für eine unabhängige Bewegung des Spitzenkopfes (40) in drei rechtwinklig aufeinander stehenden Richtungen läuft.

5. Apparat nach Anspruch 1, wobei der Arm (30) bei Abwesenheit von Zufuhr von Leistung zu der Einrichtung zum Bewegen des Arms an einem feststehenden Ort bleibt.

6. Apparat nach Anspruch 1, wobei die X- und Y-Schienen in der Horizontalebene des Apparates ausgerichtet sind,

wenn der Apparat in seiner normalen Betriebsausrichtung ist.

7. Apparat nach Anspruch 1, wobei der Apparat weiterhin einen Flüssigkeitsvorratsbehälter in wählbarer Fluidkommunikation mit dem Hohlspitzenkopf (40) aufweist.

8. Apparat nach Anspruch 1, wobei die Einrichtung zum Zuführen von Gasdruck einen Druckgas-Vorratsbehälter oder einen Kompressor (170) aufweist.

9. Apparat nach Anspruch 1, wobei die Einrichtung zum Zuführen von Druckgas eine feststehende Menge Gas durch den Spitzenkopf (40) ziehen oder freigeben kann, wobei die feststehende Menge durch die Steuerung wählbar ist, wodurch eine bemessene Menge Flüssigkeit von einer Reagenz-Aufbringspitze, die am Hohlspitzenkopf befestigt ist, abgezogen oder freigegeben wird.

10. Apparat nach Anspruch 9, wobei die Einrichtung zum Zuführen von Druckgas einen bewegbaren Kolben hat, der die Flüssigkeit in einer Flüssigkeitsversorgungsleitung zwischen dem Flüssigkeitsvorratstank und dem Hohlspitzenkopf (40) steuert.

11. Apparat nach Anspruch 10, wobei die Einrichtung zum Zuführen von Druckgas einen Druckgas-Vorratstank oder Kompressor aufweist, wobei bewegbare Kolben und die Einrichtung zum abwechselnden Wählen des Vorratstanks oder des Kolbens dazu dienen, Gas durch den Spitzenkopf (40) freizugeben oder herauszuziehen.

12. Apparat nach Anspruch 1, wobei die Wasch/Blas-Spitze (70) an dem Hohlspitzenkopf (40) über eine Preßpassung befestigt ist.

13.07.99

13. Apparat nach Anspruch 12, wobei der Wasch/Blas-Spitzenhalter (80) so ausgebildet ist, daß er die Wasch/Blas-Spitze (70) am Halter freigibt, wenn der Spitzenkopf (40) vom Arm (30) auf die Wasch/Blas-Spitze (70) gedrückt wird, und der Spitzenkopf (40) vom Halter in einer ersten Richtung relativ zum Halter abgezogen wird.

14. Apparat nach Anspruch 12, wobei der Wasch/Blas-Spitzenhalter (80) so ausgebildet ist, daß die Wasch/Blas-Spitze (70) vom Spitzenkopf (40) entfernt werden kann, wenn die Wasch/Blas-Spitze (70) an den Spitzenkopf in den Wasch/Blas-Spitzenhalter (80) eingesetzt ist, und der Spitzenkopf vom Halter in einer zweiten Richtung relativ zum Halter abgezogen werden kann.

15. Apparat nach Anspruch 1, wobei der Reagenz-Aufbringspitzenhalter (100) so ausgebildet ist, daß er einen Behälter verfügbarer Spitzen (90) zurückhält, wodurch die Spitzen durch den Behälter als ein Feld von Spitzen in einer festliegenden Ausrichtung für den Zugriff durch den Spitzenkopf zurückgehalten werden.

16. Apparat nach Anspruch 1, weiterhin mit einem oder mehreren zusätzlichen Haltern für Reagenzbehälter an feststehenden Orten am Rahmen.

17. Apparat nach Anspruch 1, wobei der Apparat weiterhin eine Heizeinrichtung (200) für Mikroskopobjektträger an dem vierten Ort aufweist.

18. Apparat nach Anspruch 1, wobei der Apparat weiterhin einen auswechselbaren Mikroskoptrog (190) hat, der so ausgebildet ist, daß er eine Vielzahl von Mikroskop-Objektträgern in einem ersten Feld des vierten Ortes halten kann.

13.07.99

19. Apparat nach Anspruch 18, wobei der Trog (190) individuelle Wannen für Mikroskop-Objektträger hat und die Wannen teilweise an ihrer Unterseite offen sind.

20. Apparat nach Anspruch 19, weiterhin mit einer Mikroskop-Objektträger-Heizfläche, wobei, wenn der Trog (190) mit irgendwelchen Mikroskop-Objektträgern in dem Trog in den Mikroskop-Objektträgerhalter (140) eingesetzt wird, die Mikroskop-Objektträger die Heizfläche über die teilweise offene Bodenfläche der Wannen kontaktiert.

21. Apparat nach Anspruch 20, wobei einzelne Segmente der Heizfläche durch die Steuerung gesteuert werden, wobei für die Segmente unterschiedliche Temperaturen geschaffen werden.

22. Apparat nach Anspruch 1, wobei die Steuerung einen programmierbaren Computer aufweist.

23. Apparat nach Anspruch 1, wobei die Steuerung bewirkt, daß Gas durch die Wasch/Blas-Spitze geblasen wird, wenn die Wasch/Blas-Spitze horizontal über den Mikroskop-Objektträger bewegt wird.

24. Apparat nach Anspruch 1, wobei die Steuerung bewirkt, daß eine Reagenzspitze (90) an dem Spitzenkopf (40) ein feststehendes Volumen des Reagenz aus dem Behälter zieht und für den Transport hält, dann bewirkt, daß der Spitzenkopf (40) zu einem Ort oberhalb eines Mikroskop-Objektträgers (130) in dem Mikroskop-Objektträgerhalter (140) läuft, und dann bewirkt, daß die Reagenzspitze (90) ein feststehendes Volumen des Reagenz auf den Mikroskop-Objektträger (130) freigibt.

25. Verfahren zum Aufbringen eines wasserlöslichen Gewebereagenz auf einen Mikroskop-Objektträger, auf welchem Gewebeproben aufgebracht sind, wobei das Verfahren aufweist:



13.07.99

Aufbringen eines Wasserfilms auf eine horizontale obere Fläche des Objektträgers; und

Aufbringen des Reagenz auf den Wasserfilm in einem Muster, das nicht ausreicht, die Objektträger-Oberfläche vollständig zu bedecken, wenn der Objektträger trocken ist, wodurch das Reagenz durch den Film diffundiert, um im wesentlichen die gesamte Oberfläche zu erreichen.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Film ein Volumen von 0,13 bis 1,7 Mikroliter pro Quadratcentimeter Oberfläche hat.

27. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Wasser nicht-wässrige Komponenten gelöst oder suspendiert enthält.

28. Verfahren nach Anspruch 27, wobei das Wasser einen grenzflächenaktiven Stoff enthält.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei das Wasser weiterhin einen Puffer enthält.

30. Verfahren zum Einfärben eines Gewebes auf einem Mikroskop-Objektträger, mit:

Aufbringen von überschüssigem Wasser auf einen Mikroskop-Objektträger, der so ausgerichtet ist, daß er eine horizontale Oberfläche hat, auf der das Gewebe liegt;

Entfernen des Wassers von dem Objektträger durch Blasen eines Gases über die horizontale Fläche durch einen Schlitz, während der Schlitz horizontal über die Fläche in der Nähe der Fläche bewegt wird, wobei auf der Fläche ein Wasserfilm verbleibt;

Aufbringen eines Reagenz auf die Oberfläche in einem Strom oder intermittierend in einem Muster, das so ausgebildet

13.07.99

ist, daß es ein Diffundieren des Reagenz durch den Wasserfilm erlaubt, wobei das Muster nicht ausreicht, die Oberfläche vollständig zu bedecken, wenn die Oberfläche trocken ist; und

Zulassen, daß das Reagenz das Gewebe auf der Oberfläche färbt.

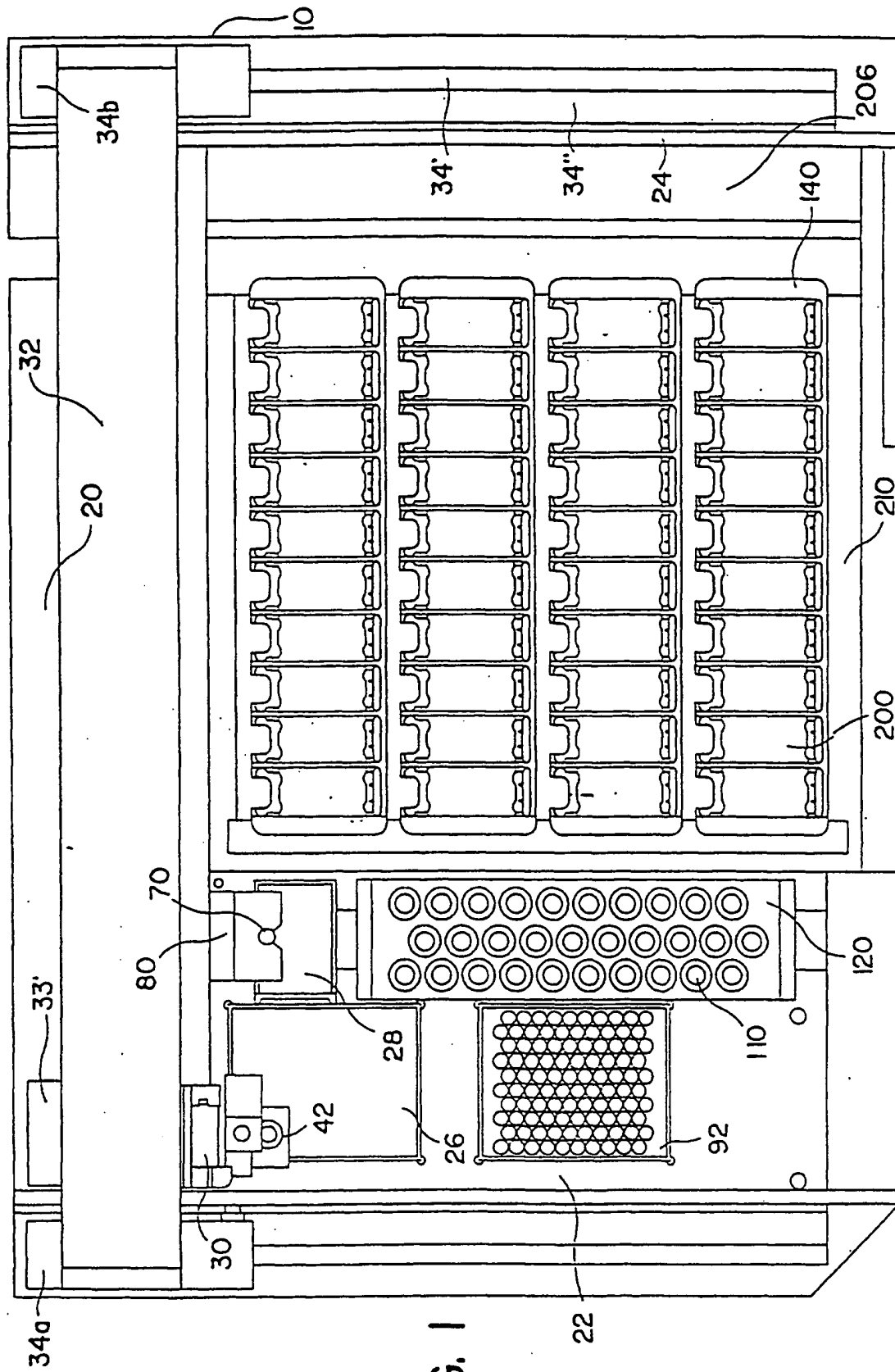
31. Wasch/Blas-Spitze für einen automatischen Einfärbungsapparat, mit:

einem Hohlkörperelement, das aus wenigstens zwei lösbaren Teilen besteht, die einen Innenhohlraum haben, der zugänglich ist, wenn die Teile gelöst sind;

einem linearen Ausgangsschlitz, der eine Fluidkommunikation zwischen dem Innenhohlraum und der Außenumgebung, welche die Spitze umgibt, schafft, wobei der lineare Ausgangsschlitz so ausgebildet ist, daß er im wesentlichen eine Länge hat, die identisch mit der Breite eines Mikroskop-Objektträgers ist;

einer Einrichtung zum entfernbaren Befestigen des Hohlkörperelementes an einem Spitzenkopf in dem Apparat und Vorsehen eines Zugangs zum Innenhohlraum für Gas oder Flüssigkeit, die durch den Spitzenkopf zugeführt werden.

32. Spitze nach Anspruch 31, wobei die Einrichtung zum lösbaren Befestigen eine hohle Röhre aufweist, die mit dem Innenhohlraum in Verbindung steht, und so ausgebildet ist, daß sie durch eine Presspassung mit dem Spitzenkopf verbunden werden kann.



16

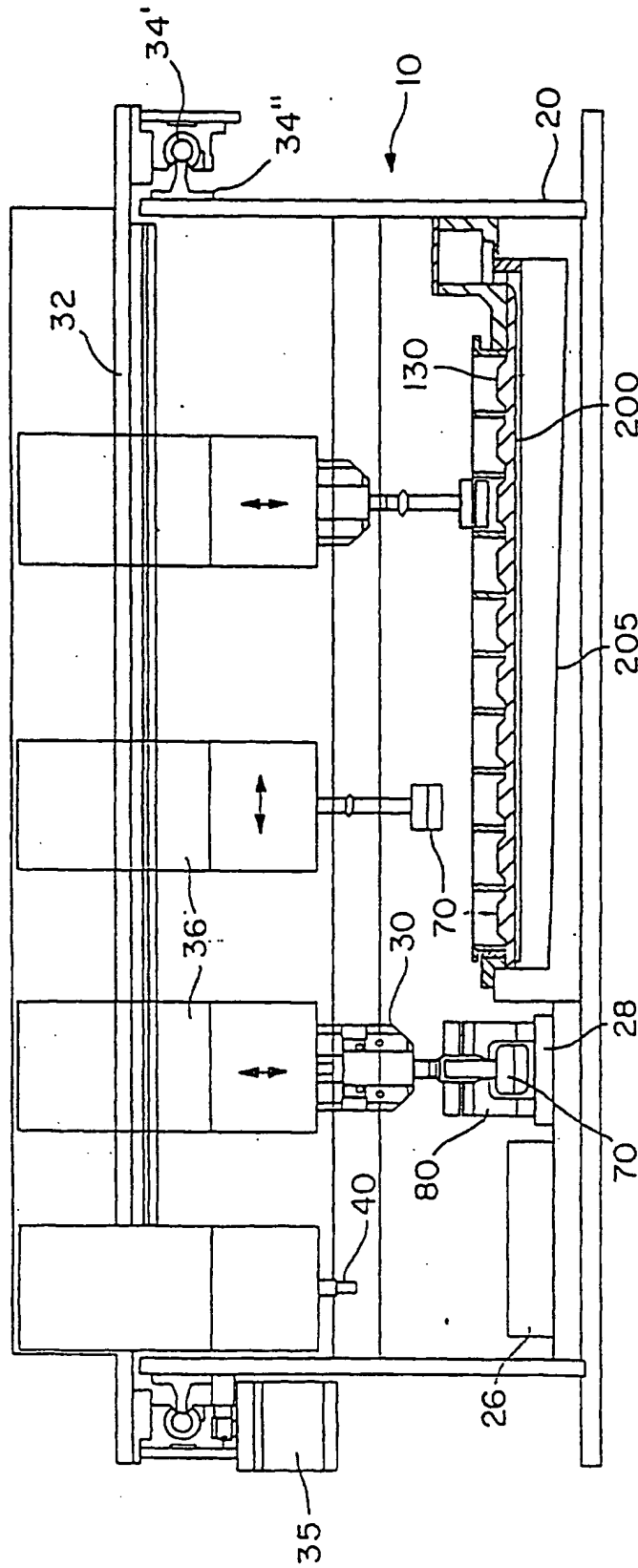


FIG. 2

13.07.99

3/12

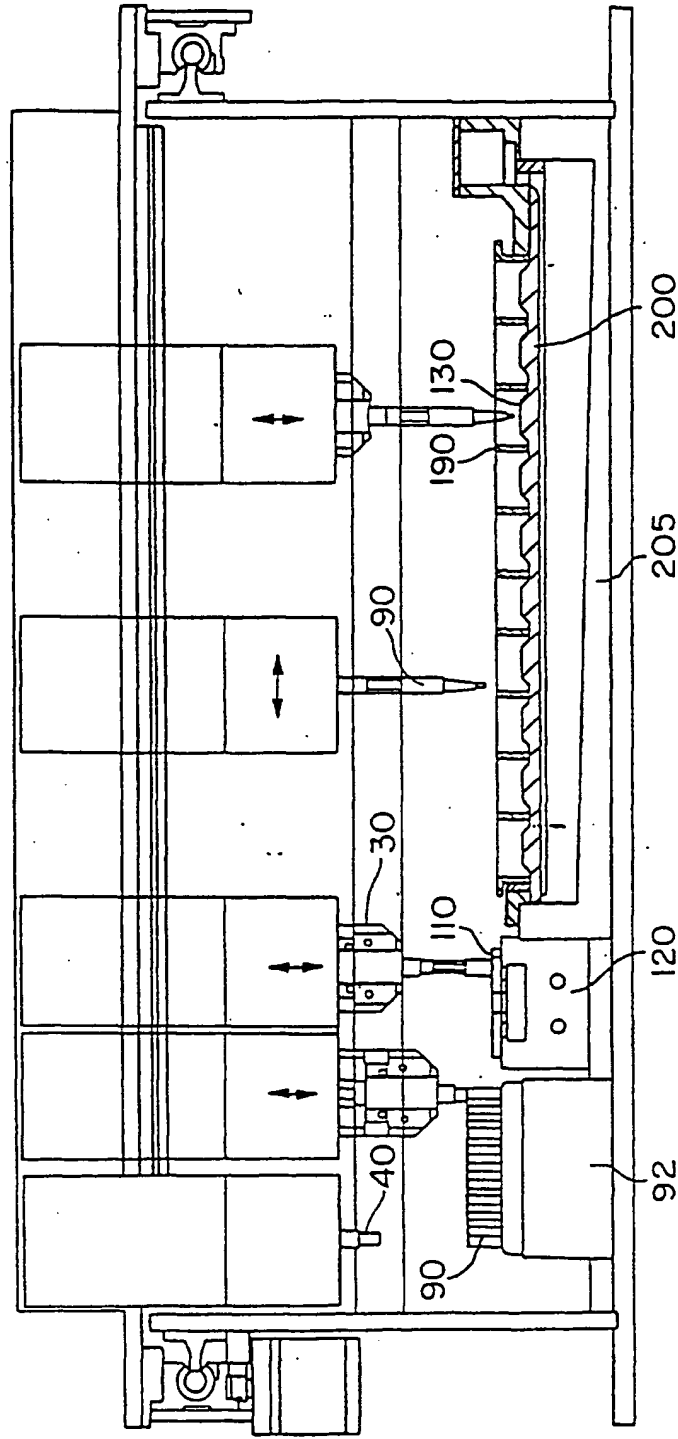


FIG. 3

13.07.99

4/12

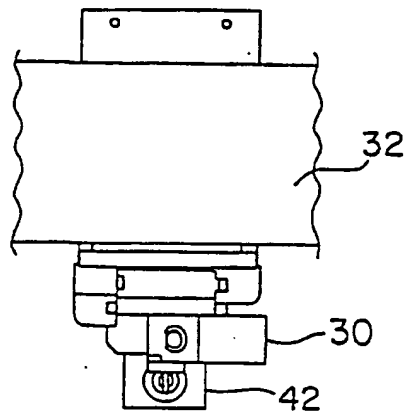


FIG. 4A

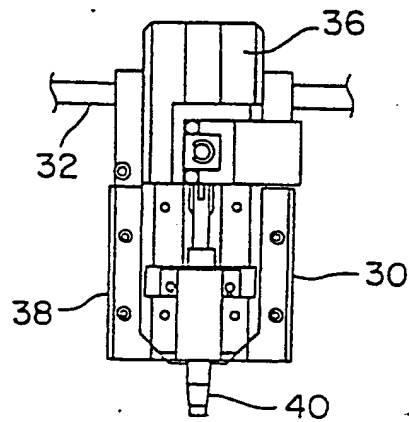


FIG. 4B

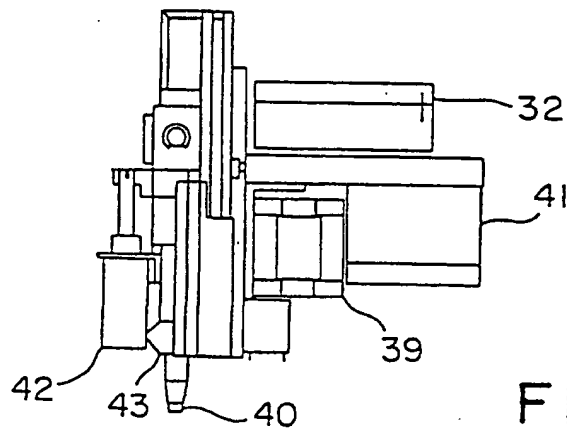
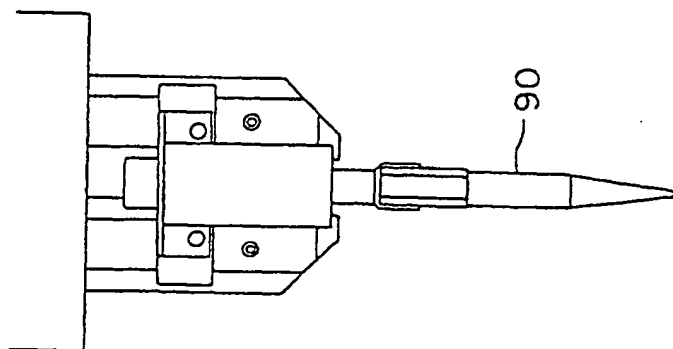
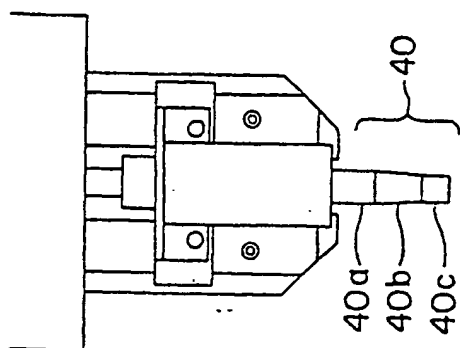
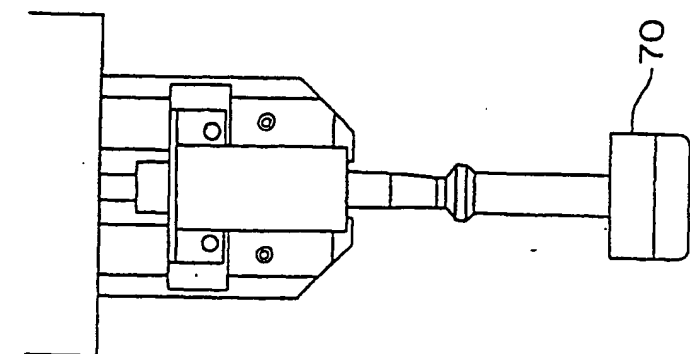


FIG. 4C

13.07.99

5/12



13.07.99

6/12

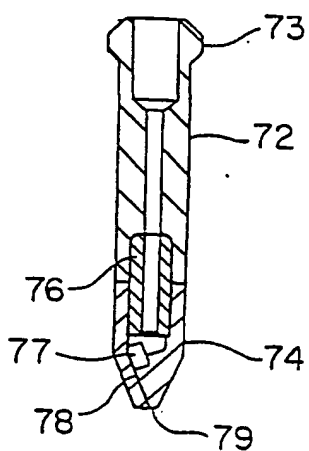


FIG. 6A

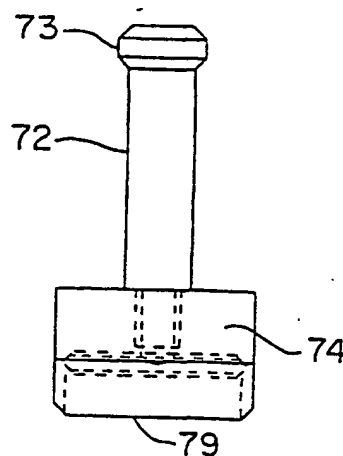


FIG. 6B



FIG. 6C



13.07.99

7/12

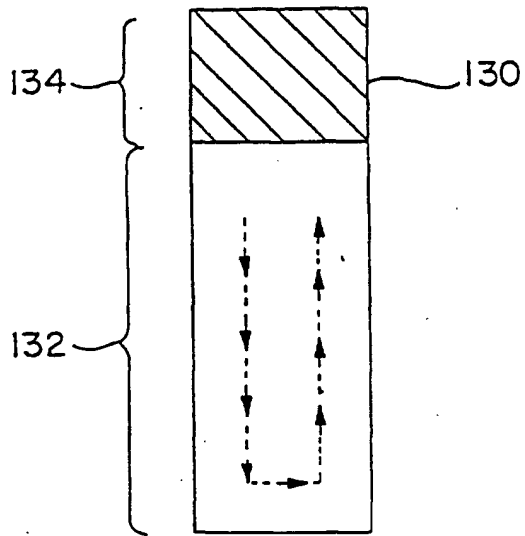


FIG. 7A

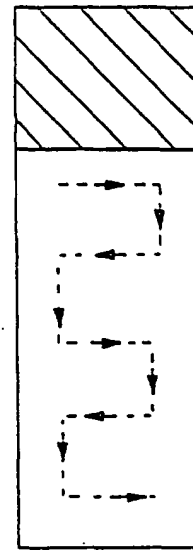


FIG. 7B

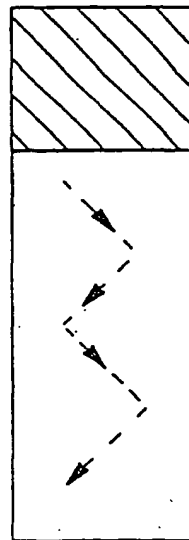


FIG. 7C

13.07.99

8/12

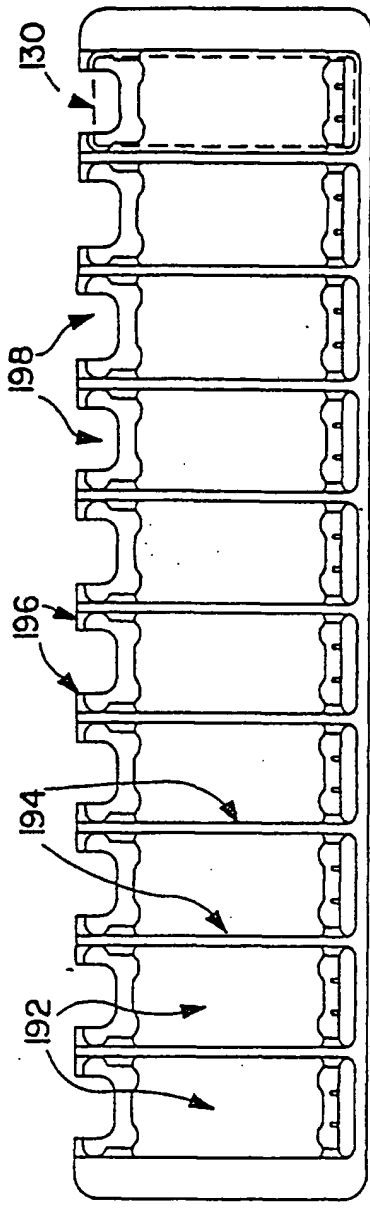


FIG. 8A



FIG. 8B

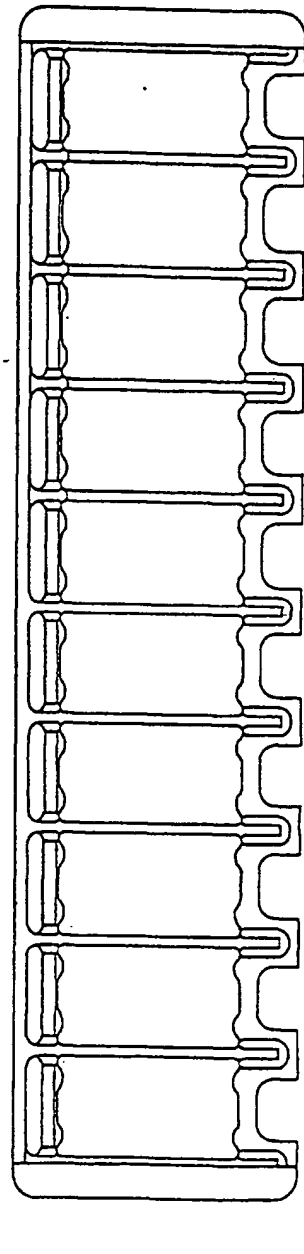


FIG. 8C

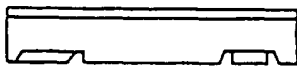


FIG. 8D

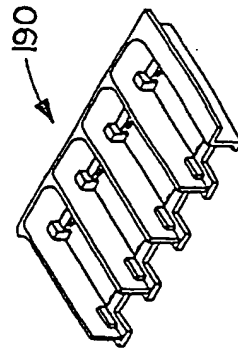


FIG. 8E

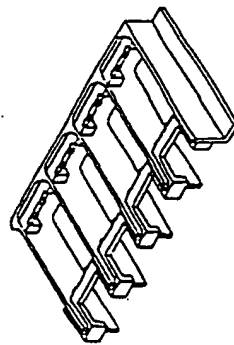


FIG. 8F

13.07.99

9/12

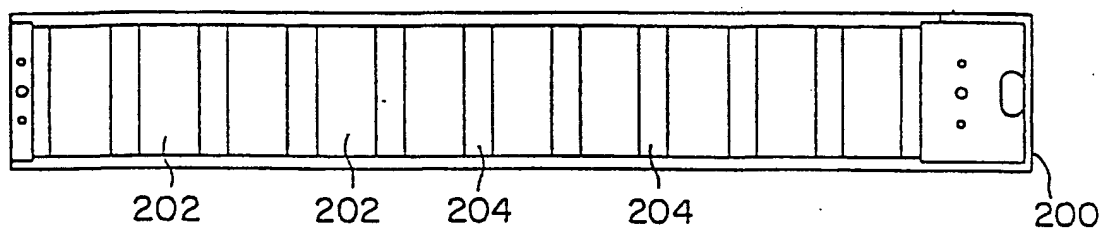


FIG. 9A

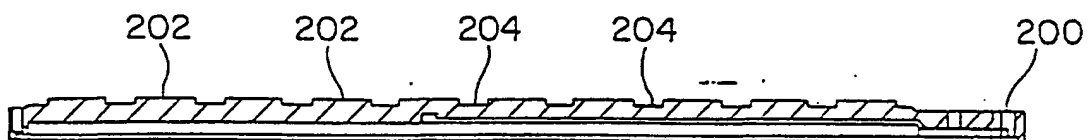


FIG. 9B

13.07.99

10/12

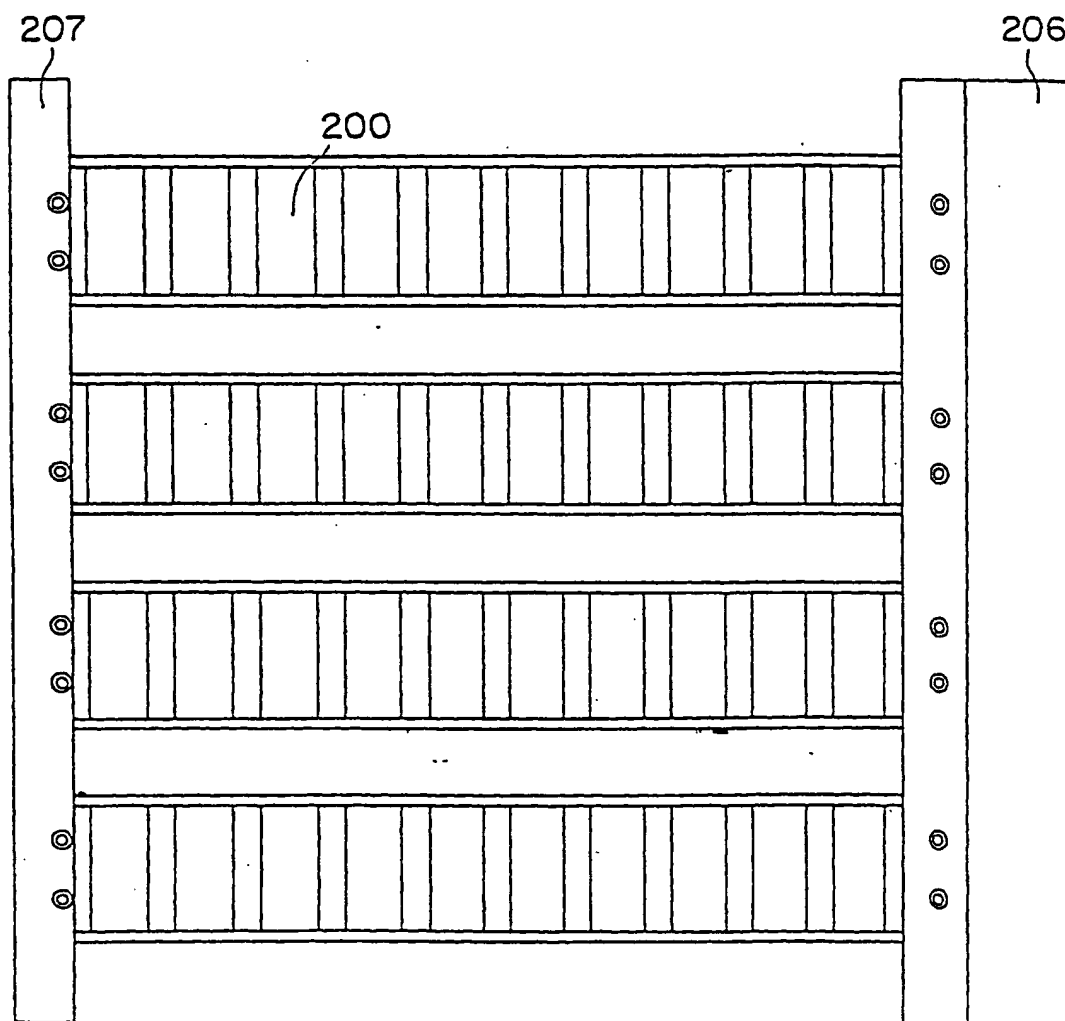


FIG. 10

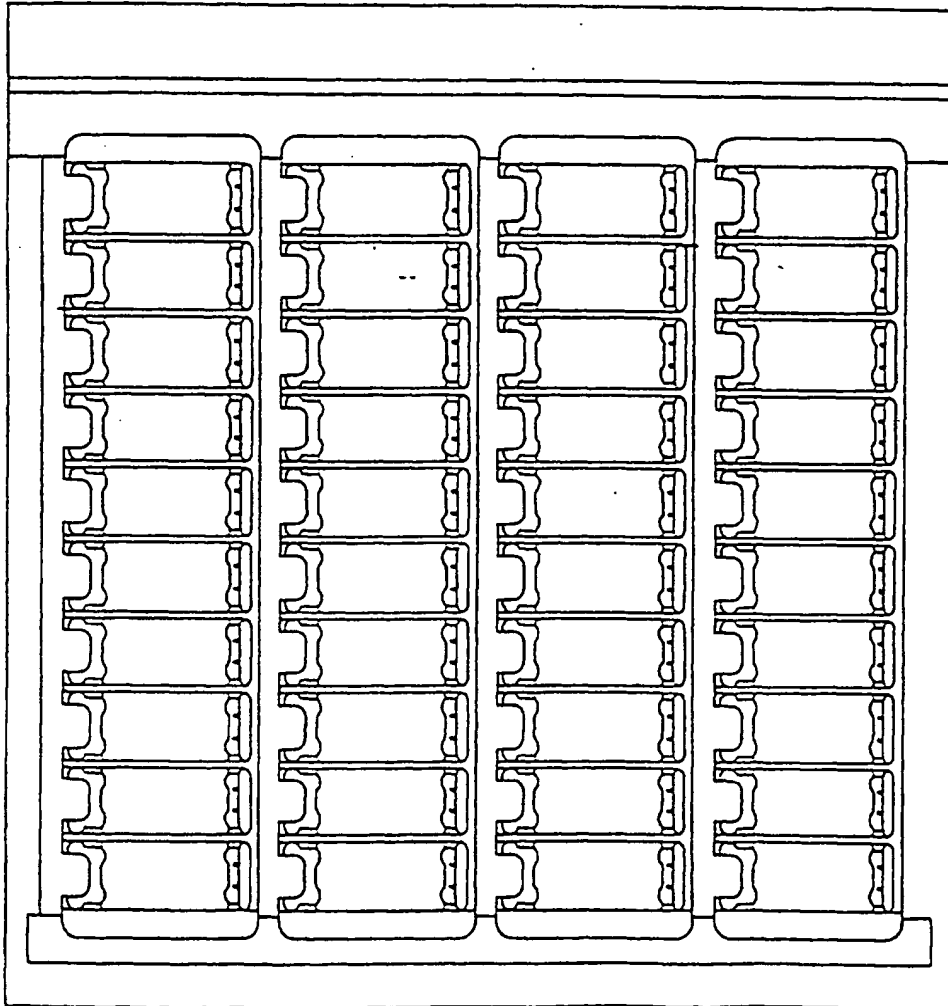


FIG. 11A

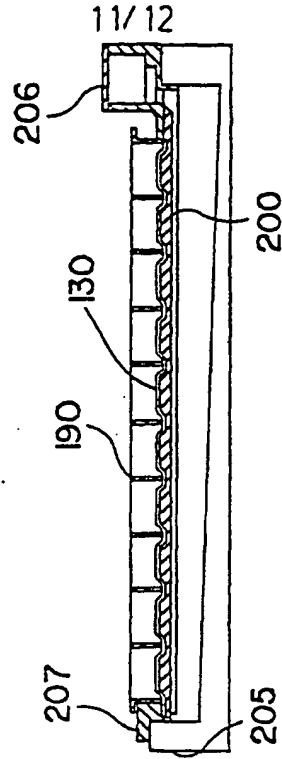


FIG. 11B

100799

12/12

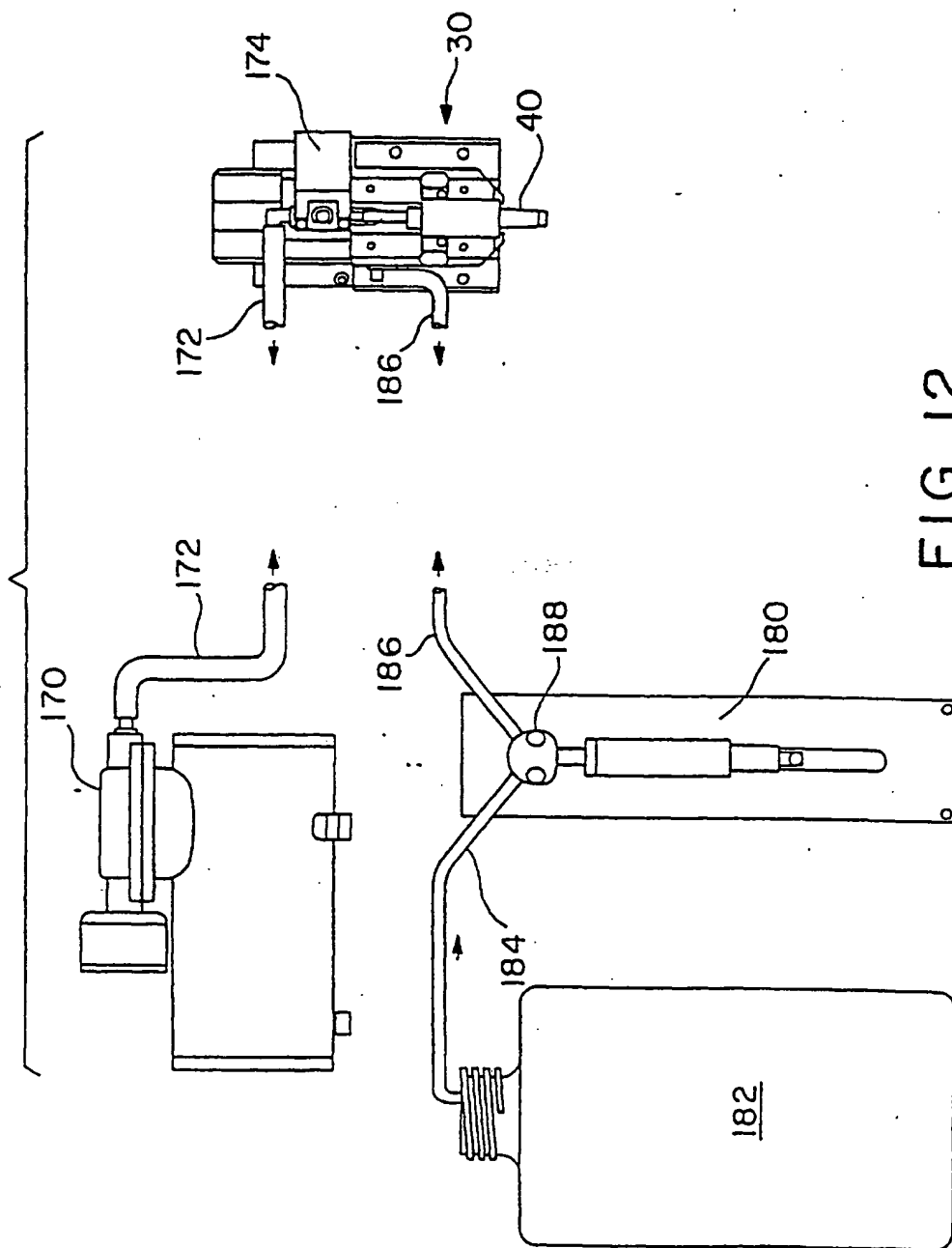


FIG. 12

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**